

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**K203: Charakterisierung eines CC-Chemokins beim  
Haushuhn**

von Melanie Carolin Reger  
aus Mindelheim

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Lehrstuhl für Physiologie, Physiologische Chemie und  
Tierernährung**

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

<b>Dekan:</b>	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
<b>Berichterstatter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers
<b>Korreferent:</b>	Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korbel

**Tag der Promotion:** 31. Januar 2015

## Meiner Familie

*„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt“* (Sir Isaac Newton, englischer Mathematiker, Physiker und Astronom)

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>16</b>
2.1	Die Entdeckung der Chemokine .....	16
2.1.1	Interleukin-8: Das erste bekannte Chemokin.....	16
2.2	Chemokine .....	17
2.2.1	Aufbau und Struktur .....	17
2.2.2	Funktionen .....	21
2.2.3	Chemokinrezeptoren .....	22
2.3	Das Chemokinsystem beim Huhn.....	27
2.4	Das aviäre CC Chemokin K203.....	29
2.4.1	Eingruppierung .....	29
2.4.2	Rezeptoren von K203 .....	29
2.4.3	K203 Expression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	30
2.4.4	CCL16 des Menschen.....	30
2.5	Salmonelleninfektion des Huhnes.....	32
2.5.1	Taxonomie und Vorkommen .....	32
2.5.2	Infektionswege und Klinik.....	32
<b>3</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>35</b>
4.1	Tiere, Tierhaltung und Infektion.....	35
4.1.1	Hühner .....	35
4.1.2	Mäuse.....	35
4.1.3	Kaninchen.....	36
4.1.4	Infektion der Hühner mit <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	36
4.1.5	Infektion der Broiler mit <i>Campylobacter jejuni</i> .....	37
4.2	Isolierung primärer Leukozyten.....	37
4.2.1	Gewinnung von Blut und Organen .....	38
4.2.2	Gewinnung peripherer mononukleärer Blutzellen.....	38
4.2.3	Gewinnung von Zellen aus Milz, Bursa und Thymus .....	38
4.2.4	Mikroskopische Beurteilung der Zellen.....	38
4.3	Zellkultur .....	39
4.3.1	Medien und Zusätze.....	39
4.3.2	Kultivierung der Zelllinien .....	40
4.3.3	Kultivierung und Stimulation primärer Zellen .....	40
4.3.4	Einfrieren von Zellen .....	42
4.3.5	Auftauen von Zellen .....	42
4.4	Immunohistochemie.....	42
4.4.1	Anfertigen der Gewebeschnitte.....	42
4.4.2	Färben der Gewebeschnitte.....	43

4.5	Herstellung monoklonaler Maus-Antikörper .....	44
4.5.1	Immunisierung von Balb/c-Mäusen .....	44
4.5.2	Zellfusion .....	44
4.5.3	Screening .....	45
4.5.4	Subklonierung, Isotyp-Bestimmung und Gewinnung von Hybridoma- Überständen .....	46
4.6	Aufreinigung von Zellkulturüberständen über M2-Flag Säule .....	46
4.7	SDS-Gel .....	48
4.8	Western Blot .....	50
4.9	Herstellung und Aufreinigung eines K203-Antiserums .....	51
4.9.1	Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen K203 .....	52
4.9.2	Aufreinigung des Kaninchenserums mittels Affinitätschromatographie .....	52
4.10	RNA-Präparation .....	53
4.10.1	Gewebehomogenisierung .....	53
4.10.2	RNA-Isolierung .....	53
4.10.3	Qualitätskontrolle von RNA mittels des Agilent 2100 Bioanalyzer .....	54
4.11	cDNA-Synthese .....	55
4.12	Erstellen von Primern .....	55
4.13	Polymerase Kettenreaktion .....	56
4.13.1	PCR mittels Phusion Hot Start II oder Hotstart Firepol Polymerase .....	56
4.13.2	Quantitative RT-Polymerase Kettenreaktion .....	57
4.14	Agarose-Gelelektrophorese .....	57
4.14.1	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen oder PCR-Reaktionen .....	58
4.14.2	Verdau von Vektoren und Inserts durch Restriktionsenzyme .....	58
4.15	Klonierung .....	59
4.15.1	Dephosphorylierung von Vektoren mittels CIAP .....	59
4.15.2	Ligationsreaktion .....	59
4.15.3	Klonierung mittels Gibson Assembly .....	60
4.15.4	Klassische Transformation von Bakterien (JM109) .....	60
4.15.5	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen .....	61
4.15.6	Ligationskontrolle .....	61
4.16	Eukaryotische Expression rekombinanter Proteine .....	62
4.16.1	Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen bzw. HEK293F-Zellen .....	62
4.16.2	Stabile Transfektion von HEK293-Zellen .....	63
4.17	Durchflusszytometrische Untersuchungen .....	63
4.17.1	Färbung mit direkt Fluorochrom-markierten Antikörpern .....	64
4.17.2	Indirekte Färbung .....	65
4.17.3	Lebend/Tot-Färbung mit 7-AAD .....	65
4.18	Zellsortierung .....	66
4.18.1	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) .....	66
4.18.2	Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS) .....	67
4.19	Chemotaxis-Assays .....	68
4.20	Statistik .....	70

---

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>71</b>
5.1	Expression von K203 in stimulierten primären Makrophagen .....	71
5.2	Expression von K203 in <i>Salmonella</i> Enteritidis infiziertem Caecalgewebe.....	72
5.3	Expression von K203 in <i>Campylobacter jejuni</i> infiziertem Caecalgewebe.....	73
5.4	Infiltration von Makrophagen ins Caecalgewebe von Hühnern nach .....	74
5.5	Salmonelleninfektion.....	74
5.6	Klonierung von K203, K203-Flag und K203-hu-Fc.....	76
5.6	Durchflusszytometrische Untersuchungen .....	76
5.6.1	K203-Bindungsstudien mit PBMCs aus Blut, Milz und Bursa .....	77
5.6.2	K203-Bindung an Thymozyten .....	80
5.6.3	Test verschiedener Zelllinien auf K203-Bindung.....	81
5.7	Bindungsstudien zu den Rezeptoren chCCRa, chCCRb und chCCRc .....	82
5.8	Analyse der Expression von chCCRa und chCCRb in verschiedenen .....	84
	Zellpopulationen .....	84
5.9	Generierung monoklonaler Antikörper gegen chCCRa und chCCRb .....	86
5.10	Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen K203 im Kaninchen .....	87
5.11	Migrationsassays.....	88
5.11.1	K203-abhängige Migration von HP89 Zellen .....	88
5.11.2	K203-abhängige Migration von primären Hühnermakrophagen.....	90
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>93</b>
6.1	Genexpressionsanalysen von K203 <i>in vitro</i> .....	94
6.2	Genexpressionsanalysen von K203 <i>in vivo</i> .....	95
6.3	Immunohistochemie.....	97
6.4	Durchflusszytometrische Untersuchungen .....	98
6.5	Die Rezeptoren chCCRa, chCCRb und chCCRc.....	100
6.6	Migrationsassays.....	101
6.7	Ausblick.....	103
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>110</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>122</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>125</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> Tertiärstruktur eines Chemokins (nach Florian Busalt [7]) .....	<b>18</b>
<b>Abbildung 2:</b> Einfache schematische Darstellung des Aufbaus der Chemokine der vier Chemokinfamilien (modifiziert nach Köhidai et al., 2008) .....	<b>20</b>
<b>Abbildung 3:</b> Vereinfachtes Diagramm der humanen Rezeptoren und ihrer Liganden (modifiziert nach Zlotnik et al. [49]).....	<b>24</b>
<b>Abbildung 4:</b> Tertiärstruktur eines typischen Chemokinrezeptors (nach Florian Busalt [7]) .....	<b>25</b>
<b>Abbildung 5:</b> Signalkaskaden nach Chemokin-Bindung am Beispiel von CXCL12/CXCR4 (modifiziert nach Wu et al., 2009 [62]) .....	<b>27</b>
<b>Abbildung 6:</b> In vitro Expressionsniveau (vs. Kontrolle) von K203 in Hühnermakrophagen nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden und IFN $\gamma$ .....	<b>73</b>
<b>Abbildung 7:</b> In vivo Expressionsniveau von K203 in Caecalgewebe von Salmonellen-infizierten Hühnern (n=3) (berechnet auf Basis der nicht-infizierten Kontrolltiere (n=3) .....	<b>74</b>
<b>Abbildung 8:</b> Vergleichende Darstellung der 40-dCT-Werte von K203 fünf Tage nach Infektion von 22 Tage alten Broilern mit Campylobacter jejuni Stamm M1 .....	<b>75</b>
<b>Abbildung 9:</b> Histologischer Vergleich der Anzahl von Makrophagen in der Lamina propria des Caecums nicht infizierter Tiere (links) gegenüber mit SE147 infizierten Tiere (rechts) zum Zeitpunkt 24h p.i. ....	<b>76</b>
<b>Abbildung 10:</b> Durchflusszytometrische Studie zur Bindung von K203-hu-Fc an die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen im Blut .....	<b>79</b>
<b>Abbildung 11:</b> Durchflusszytometrische Studie zur Bindung von K203-hu-Fc an die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen der Milz .....	<b>80</b>
<b>Abbildung 12:</b> Expression des K203-Rezeptors auf CD4+, CD8+ und CD4/CD8 doppelt positiven T-Zellen im Thymus .....	<b>81</b>
<b>Abbildung 13:</b> Untersuchung zu Expression des Rezeptors von K203 auf verschiedenen Hühnerzelllinien .....	<b>83</b>
<b>Abbildung 14:</b> Studie zur K203-Bindung an die Rezeptorkandidaten chCCRa, chCCRb und chCCRc .....	<b>84</b>
<b>Abbildung 15:</b> RT-PCR-Analyse der Expression von chCCRa und chCCRb in verschiedenen Zelllinien und Zellpopulationen .....	<b>86</b>
<b>Abbildung 16:</b> Durchflusszytometrische Untersuchung zur Hemmaktivität von chCCRa/b1 .....	<b>88</b>
<b>Abbildung 17:</b> Western Blot zum Test von rabbit-anti-K203 .....	<b>89</b>
<b>Abbildung 18:</b> Versuchsaufbau Migrationsassay (modifiziert nach Florian Busalt [7]) .....	<b>90</b>
<b>Abbildung 19:</b> Migration von HP89 Zellen zu verschiedenen K203-Konzentrationen .....	<b>91</b>
<b>Abbildung 20:</b> Migration von primären Monozyten/Makrophagen zu verschiedenen K203-Konzentrationen...	<b>93</b>



## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1:</b> Einteilung der humanen Chemokine, Synonyme und Rezeptoren .....	<b>21</b>
<b>Tabelle 2:</b> Zelllinien .....	<b>40</b>
<b>Tabelle 3:</b> Beschreibung und eingesetzte Konzentrationen der verwendeten Stimulanten .....	<b>42</b>
<b>Tabelle 4:</b> Auflistung aller verwendeten Primer .....	<b>56</b>
<b>Tabelle 5:</b> Allgemeine PCR-Bedingungen .....	<b>57</b>
<b>Tabelle 6:</b> Liste der hergestellten Konstrukte .....	<b>61</b>
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete primäre Antikörper .....	<b>65</b>
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete sekundäre Antikörper und Direktkonjugate .....	<b>66</b>
<b>Tabelle 9:</b> Für die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung eingesetzte Antikörper .....	<b>68</b>
<b>Tabelle 10:</b> Scores der CVI 68.1 positiven Makrophagen von nicht-infizierten und SE147-infizierten Eintagsküken im Caecum .....	<b>74</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7-AAD	7-Amino-Actinomycin-D
ABCD	Avidin-Biotin-Complex-D
ah294	Genbezeichnung für chCCL5
Akt	Syn.: Proteinkinase B
Aqua dest.	<i>aqua destillata</i>
AMAC	<i>Alternative Macrophage Activation-Associated Chemokine</i>
ARP	<i>Actin-Related Protein</i>
AT744.2	Genbezeichnung von CCL4L2
ATAC	<i>Activation-Induced, T-Cell-Derived and Chemokine-Related Cytokine</i>
β-R1	<i>Beta-Receptor-1</i>
β-TG	Beta-Thromboglobulin
BCA-1	<i>B Cell Attracting Chemokine-1</i>
BCMA	<i>B-Cell Maturation Antigen</i>
BCR	B-Zellrezeptor ( <i>B-Cell Receptor</i> )
BLC	<i>B Lymphocyte Chemoattractant</i>
bp	Basenpaare
BRAC	<i>Breast and Kidney Cell Chemokine</i>
Bu-1	Typ I Glykoprotein, identisch mit <i>chB6</i>
C. jejuni	<i>Campylobacter jejuni</i>
Ca	Calcium
Cbl/Cbl-b	<i>Casitas B-Lineage Lymphoma-b</i> (E3 Ubiquitin Ligase)
CCL	CC-Ligand (Chemokin)
CCF18	CC Chemokin F18
CCR	Rezeptor für CC-Chemokine
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cdc42	<i>Cell Division Cycle 42</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CEF	<i>Chicken Embryo Fibroblasts</i>
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>
ch	<i>Chicken</i>
chCAF	<i>Chicken Chemotactic and Angiogenic Factor</i>
Ckβ	<i>Chemokine-Beta</i>
CpG-ODN	<i>CpG-Oligodesoxynukleotide</i>
CRAC	<i>Calcium Release Activated Calcium Channel</i>
CRAM	<i>Chemokine Receptor on Activated Macrophages</i>
CRG	<i>Cytokine Responsive Gene</i>
CRK	Proto-Onkogen c-Crk (p38)
CTACK	<i>Cutaneous T-Cell Attracting Chemokine</i>
CTAP	<i>Connective Tissue Activating Protein</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CXCL	CXC-Ligand (Chemokin)
CXCR	Rezeptor für CXC-Chemokin
Cys	Cystein

---

D6	<i>Decoy-Receptor 6</i>
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DC-CK1	<i>Dendritic Cell Chemokine-1</i>
DARC	<i>Duffy Antigen Receptor for Chemokines</i>
DMC	<i>Dendritic Cell and Monocyte Chemokine-like Protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
DRY	Asparaginsäure-Arginin-Tyrosin
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
E. faecalis	<i>Enterococcus faecalis</i>
eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ELC	<i>EBI-1-Ligand Chemokine</i>
ELR	Glutaminsäure-Leucin-Arginin
ERK	<i>Extracellular-Signal Regulated Kinase</i>
ENA-78	<i>Epithelial Neutrophil-Activating Protein 78</i>
et al.	und andere ( <i>et alii</i> )
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FBS	Fetales Bovines Serum
FITC	Fluoroisothiocyanat
FPRL	<i>Formyl Peptide Receptor-like</i>
G418	Geneticin
GAG	Glykosaminoglykan
GCP	<i>Granulocyte Chemotactic Peptide</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor ( <i>G-protein coupled receptor</i> )
GRK	<i>G-protein-Coupled Receptor Kinase</i>
Gro	<i>Growth Regulated Oncogene</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HCC	<i>Hemofiltrate CC-Chemokine</i>
HEK-293	<i>Human Embryonic Kidney-293</i>
Hu-Fc	Humanes Fc-Tag
ICAM-1	<i>Intracellular Adhesion Molecule 1</i>
I-309	Name des cDNA Klonen CCL1
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL-8	Interleukin-8
IL7R $\alpha$	Interleukin-7 Rezeptor alpha
IL-12	Interleukin-12
IL-18	Interleukin-18
ILC	<i>Interleukin-11 Receptor Alpha-Locus Chemokine</i>
IMAC	<i>Intestinal Macrophages</i>
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP	<i>Interferon-inducible protein</i>

---

I-TAC	<i>Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant</i>
JAK	Januskinase
K203	Klon 203
K203-R	Rezeptor von Klon 203
K60	Klon 60
kDa	Kilo-Dalton
LARC	<i>Liver and Activation Regulated Chemokine</i>
LEC	<i>Liver-Expressed Chemokine</i>
LIMK	<i>LIM Domain Kinase</i>
LITAF	<i>Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor-alpha Factor</i>
LMC	<i>Lymphocyte and Monocyte Chemoattractant</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSL	<i>Lohmann's Selected Leghorn</i>
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>
MARC	<i>Macrophage and Activation Regulated Chemokine</i>
MCIF	<i>Melanocyte Contact Inhibitory Factor</i>
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
MDC	<i>Macrophage-Derived Chemoattractant</i>
MDNCF	<i>Monocyte-Derived Neutrophil Chemotactic Factor</i>
MDP	Muramyl-dipeptid
MDV	<i>Marek's Disease Virus</i>
MEC	<i>Mammary Enriched Chemokine</i>
MEK	Mitogene und extrazellulär regulierte Kinase
MIG	<i>Monokine Induced by Gamma-Interferon</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MLC	<i>Myosin Light Chain</i>
MoDcs	<i>Monocyte-Derived Dendritic Cells</i>
MPIF	<i>Myeloid Progenitor Inhibitory Factor</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MRP	<i>Macrophage Inflammatory Protein-related Protein</i>
MTN	Monotaktin
NAF	<i>Neutrophil Activating Factor</i>
NAP	<i>Neutrophil-Activating Protein</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-Cell</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOD	<i>Nucleotide-Binding Oligomerization Domain</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
p130 Cas	<i>p130 Crk-Associated Protein</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PAK	<i>P21-Activated Kinase</i>
PARC	<i>Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PBSF	<i>Pre-B-Cell Growth Stimulating Factor</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PE	Phycoerythrin

---

PEP	Phosphoenolpyruvat
PF4	<i>Platelet Factor-4</i>
p.i.	<i>post infectionem</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PITPNM	PYK-2 N-Terminal Domain-Interacting Receptor
PKB	Proteinkinase B
PLC	Phospholipase C
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Poly I:C	<i>Polyinosinic Polycytidylic Acid</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
p.s.	<i>post stimulationem</i>
PTX	Pertussistoxin
PYK	Pyruvat-Kinase
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion ( <i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> )
R848	Imidazoquinoline Resiquimod 848
Rac	<i>Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate</i>
RANTES	<i>Regulated Upon Activation Normal T-Cell Expressed and Presumably Secreted</i>
Rap1	<i>Ras-Related Protein 1</i>
RBE	<i>Recent Bursal Emigrants</i>
REV	<i>Reticuloendotheliosis Virus</i>
RGS	<i>Regulator of G-Protein Singnalling</i>
RHOA	<i>Ras Homolog Family Member</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
ROCK	Rho-Kinase
ROI	<i>region of interest</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
S. Enteritidis	<i>Salmonella enterica ssp. enterica serovar Enteritidis</i>
SCM	<i>Single C Motif</i>
SDF	<i>Stromal Derived Factor</i>
SLC	<i>Secondary Lymphoid-Tissue Chemokine</i>
SPF	<i>Specific Pathogen-Free</i>
spp.	<i>Species</i>
SRPSOX	<i>Scavenger Receptor for Phosphatidylserine and Oxidized LDL</i>
Ssp.	<i>Subspecies</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TARC	<i>Thymus and Activation Regulated Chemokine</i>
TC	Thrombozidin
TECK	<i>Thymus-Expressed Chemokine</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TSC	Humanes Eotaxin-3
TSLP	<i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i>
VAVI	<i>Vav 1 Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>

## 1 EINLEITUNG

Chemokine, eine Subfamilie der Zytokine, sind kleine sezernierte Proteine in der Größenordnung von etwa 10 kDa. Ihr Name leitet sich von ihrer Funktion ab, gerichtete Chemotaxis jeweils ansprechbarer Zellen auslösen zu können – sie sind *chemotaktische Zytokine*. Im Gegensatz zu der sehr heterogenen Gruppe der Zytokine weisen Chemokine stark konservierte strukturelle Motive auf. Eine Gruppe von vier konservierten Cysteinen bildet die Grundstruktur und formt so die typische Struktur aus drei  $\beta$ -Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix [1].

Beim Menschen sind inzwischen über 50 verschiedene Vertreter der Chemokine und etwa halb so viele Chemokin-Rezeptoren identifiziert worden. Chemokine werden in vier verschiedene Gruppen eingeteilt: CC, CXC, (X)C und CX<sub>3</sub>C Chemokine. Konstitutiv exprimierte Chemokine üben hauptsächlich homöostatische Funktionen aus und spielen besonders während der Embryonalentwicklung eine kritische Rolle in der Organo- und Angiogenese [2]. Induzierbare Chemokine gehören meist zu den sogenannten inflammatorischen Chemokinen, die eine Auswanderung von Immunzellen aus dem Blut und ihre Migration zum Infektionsort bewirken [3].

Bei Mensch und Maus ist die Chemokin-Familie inzwischen sehr gut charakterisiert, beim Huhn hingegen ist noch wenig bekannt. Genomische Analysen konnten auch beim Huhn Vertreter aller vier Chemokin-Gruppen nachweisen, davon 15 CC Chemokine, 11 CXC Chemokine und je ein Vertreter der (X)C und CX<sub>3</sub>C Chemokine [4]. Insgesamt scheint das Chemokin-Repertoire beim Huhn weitaus kleiner zu sein als beim Säuger. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass zwar viele Homologien angenommen werden, jedoch fast keines der aviären Chemokine einer näheren funktionellen Charakterisierung unterzogen wurde. Einzig K60 (CXCLi1)/Interleukin-8 (CXCLi2) und ihr Rezeptor CXCR1 [5, 6] sowie CXCL12 und sein entsprechender Rezeptor CXCR4 sind im Detail untersucht worden [7]. Gerade diese Rezeptor/Ligand Beziehung ist jedoch wichtig um die funktionelle Rolle der Chemokine in der Regulation des Immunsystems verstehen zu lernen.

Das aviäre CC Chemokin K203, das nach aktueller Nomenklatur auch chCCLi3 genannt wird, wurde erstmals im Jahr 2000 beschrieben [8, 9]. Seither ist dieses Chemokin in diversen Expressionsstudien immer wieder aufgefallen. Besonders hoch war die Expression im Darmgewebe nach Infektion von Hühnern mit *Eimeria species* [10, 11] oder Salmonellen [12-14]. Diese Beobachtungen legen eine wichtige Funktion des Chemokins in der Kontrolle enterischer Infektionen nahe. Gerade die Salmonelleninfektion ist vom zoonotischen Standpunkt von besonderem Interesse. Humane Salmonellosen zählen weltweit immer noch zu

den häufigsten lebensmittelbedingten Infektionen, auch wenn die Gesamtzahl der gemeldeten Erkrankungen seit Jahren rückläufig ist [15]. Hauptinfektionsquellen sind bis heute vor allem Geflügelfleisch, Eier und Eiprodukte [16].

K203 wird in den neuesten genomischen Analysen als Ortholog von humanem CCL16 gesehen [9]. Drei potentielle Rezeptoren, chCCRa, chCCRB und chCCRC, wurden bisher identifiziert aber nie funktionell bestätigt. Die beiden Rezeptoren chCCRa und chCCRB liegen in denselben Genregionen wie die CCL16-Rezeptoren CCR1-3, chCCRC clustert mit CCR8, ebenfalls ein Rezeptor für CCL16 [9]. Besonders interessant ist die Tatsache, dass CCL16 in der Maus nur als Pseudogen vorliegt [17]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es das aviäre Chemokin K203 besonders im Hinblick auf sein vermutetes Ortholog CCL16 detailliert zu charakterisieren um Hinweise auf seine funktionelle Rolle in der Immunantwort des Huhnes auf mukosale Infektionen zu erhalten.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Die Entdeckung der Chemokine

#### 2.1.1 Interleukin-8: Das erste bekannte Chemokin

Der Begriff Chemokin leitet sich aus der Bezeichnung *chemotaktische Zytokine* ab und deutet bereits darauf hin, wie es zur Entdeckung der Chemokine gekommen ist. Bei der Untersuchung verschiedener Interleukine wurde von einem Mitarbeiter Marco Baggiolinis, dem damaligen Leiter des Theodor-Koch-Instituts der Universität Bern, eine interessante Beobachtung gemacht. Dieser meinte, in einer Kultur von Blutmonozyten eine Substanz entdeckt zu haben, die eine zielgerichtete Wanderung von neutrophilen Granulozyten auslösen konnte. Da dies nicht durch das untersuchte Interleukin-1 zu erklären war, musste es sich um einen neue Substanz handeln. Weitere Untersuchungen führten schließlich zu der Entdeckung eines Proteins, das selektiv chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt. Dieses Protein erhielt den Namen *Neutrophil-Activating Factor* (NAF) [18, 19]. Zeitgleich wurde in den USA eine ähnliche Entdeckung publiziert - MDNCF (*Monocyte-Derived Neutrophil Chemotactic Factor*) [20]. Schnell war klar, dass es sich um dasselbe Protein handeln musste und kurze Zeit später wurde dann die einheitliche Bezeichnung Interleukin-8 festgelegt.

Interleukine sind kleine Peptide aus der Familie der Zytokine die ganz unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Die Nummerierung ist durch die Reihenfolge ihrer Entdeckung bedingt. Da im Laufe der Jahre immer mehr Moleküle mit unterschiedlichen Ursprüngen, Aufgaben und Strukturen entdeckt wurden, die zunehmend für Verwirrungen in der Nomenklatur sorgten, wurde im Jahr 1992 die Bezeichnung *Chemokine* eingeführt.

Die Entdeckung von Interleukin-8 hat der Immunologie ein neues und äußerst interessantes Forschungsgebiet erschlossen. Inzwischen sind über 50 verschiedene Chemokine bekannt und nicht weniger als 23 Rezeptoren funktionell charakterisiert [21, 22]. Durch die Einführung einer eigenständigen Nomenklatur wurde auch Interleukin-8 in CXCL8 umbenannt und reiht sich somit in die lange Reihe der CXC-Chemokine ein. Dennoch wird die Bezeichnung Interleukin-8 immer für die Entdeckung des ersten Chemokins stehen und sicher auch weiterhin Verwendung finden.



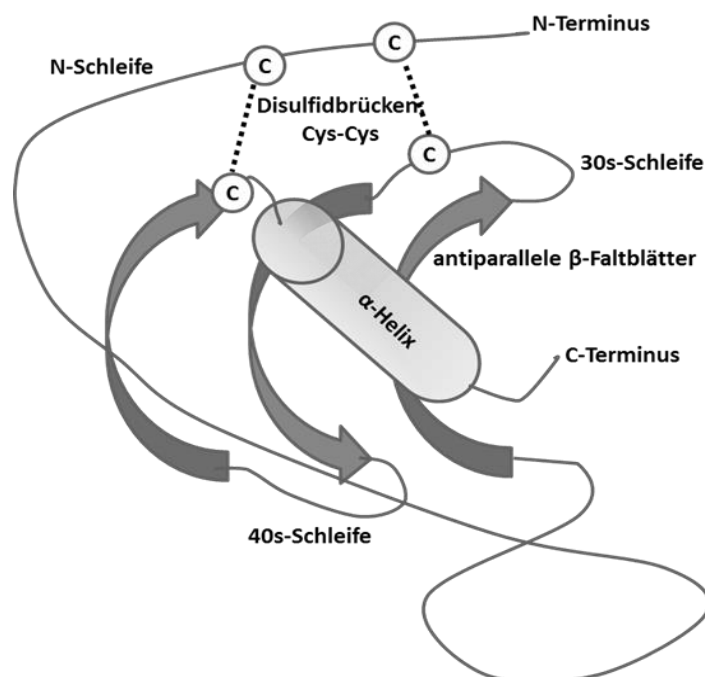
## 2.2 Chemokine

### 2.2.1 Aufbau und Struktur

Chemokine sind Peptide mit Molekulargewichten von etwa 8 bis 14 kDa. Die Bezeichnung Chemokin leitet sich von ihrer Eigenschaft ab, gerichtete Chemotaxis der Zielzellen entlang eines Konzentrationsgradienten auszulösen. Sie bestehen aus etwa 75 bis 125 Aminosäuren, deren Sequenz innerhalb der Chemokinfamilie unterschiedlich konserviert ist. Sehr streng konserviert ist hingegen ihre Tertiärstruktur, deren wichtigstes Merkmal eine Gruppe von vier Cysteinen ist, die intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden können. Die ersten beiden Cysteine sitzen nahe des N-terminalen Endes dicht beieinander, ein drittes befindet sich in der Mitte der Sequenz und das letzte befindet sich nahe des C-terminalen Endes des Moleküls. Typischerweise werden die Disulfidbrücken zwischen dem ersten und dritten sowie dem zweiten und vierten Cysteinrest ausgebildet. Der Molekülkörper bekommt so die für Chemokine typische Form eines dreisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblattes, wohingegen der Aminoterminal ungeordnet bleibt. Der Aminoterminal spielt eine wichtige Rolle bei der Rezeptorbindung, jegliche Veränderungen an dieser Stelle können eine Inaktivierung bewirken oder sogar eine antagonistische Wirkung bedingen. Der Carboxyterminus endet mit einer  $\alpha$ -Helix [1]. Abbildung 1 zeigt die typische Tertiärstruktur eines Chemokins.

**Abbildung 1: Tertiärstruktur eines Chemokins (nach Florian Busalt [7])**

Der Hauptkörper des Moleküls hat die Form eines dreisträngigen  $\beta$ -Faltblattes, das durch den Sitz der konservierten Cysteine (zwei am N-terminalen Ende und zwei weitere im weiteren Verlauf der Aminosäuresequenz, eines davon nahe des C-terminalen Endes) und die verbindenden Disulfidbrücken diese typische Struktur bekommt. Der Carboxyterminus endet mit einer  $\alpha$ -Helix.



Anzahl und Position der Cysteinreste bestimmen letztlich auch die Nomenklatur der Chemokine. Aufgrund Ihrer Struktur werden Chemokine in vier Gruppen unterteilt:

**CC Chemokine:** Chemokine dieser Subfamilie enthalten üblicherweise 4 Cysteine (C4-CC Chemokine) können aber auch 6 Cysteine enthalten (C6-CC Chemokine). Mitglieder der C6-CC Chemokine sind beispielsweise CCL1, CCL15, CCL21, CCL23 und CCL28 [23]. Die beiden aminoterminalen Cysteine liegen nebeneinander, woraus sich die Bezeichnung CC direkt ableitet, das L steht für Ligand. Beim Menschen sind bislang 28 CC-Chemokine bekannt, wobei CCL9 und CCL10 identisch sind. Zudem existieren von CCL3 und CCL4 noch die individuellen Subformen CCL3L1 bis CCL3L3, CCL4L1 und CCL4L2 [24].

**CXC Chemokine:** In dieser Gruppe sind die beiden aminoterminalen Cysteine durch eine Aminosäure getrennt, die in der Nomenklatur durch ein X symbolisiert wird. Die soweit bekannten 17 CXC Chemokine beim Menschen sind in zwei Gruppen untergliedert – die sogenannten ELR-positiven und die ELR-negativen CXC Chemokine. ELR steht für die Aminosäureabfolge Glutaminsäure – Leucin – Arginin, die in der Sequenz direkt vor den beiden N-terminalen Cysteinen stehen bzw. an dieser Stelle fehlen. Ist dieses Motiv vorhanden, so wirkt das Chemokin chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten [25], fehlt es, so bezieht sich die chemotaktische Wirkung vorwiegend auf Lymphozyten. Die Chemokine CXCL1-8, 14 und 15 sind ELR positiv, ELR negativ dagegen sind CXCL4, 9-13 und 16. Das wahrscheinlich bekannteste Beispiel eines ELR-positiven CXC Chemokins ist CXCL8 (Interleukin-8), dessen Hauptfunktion die chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten ist [26].

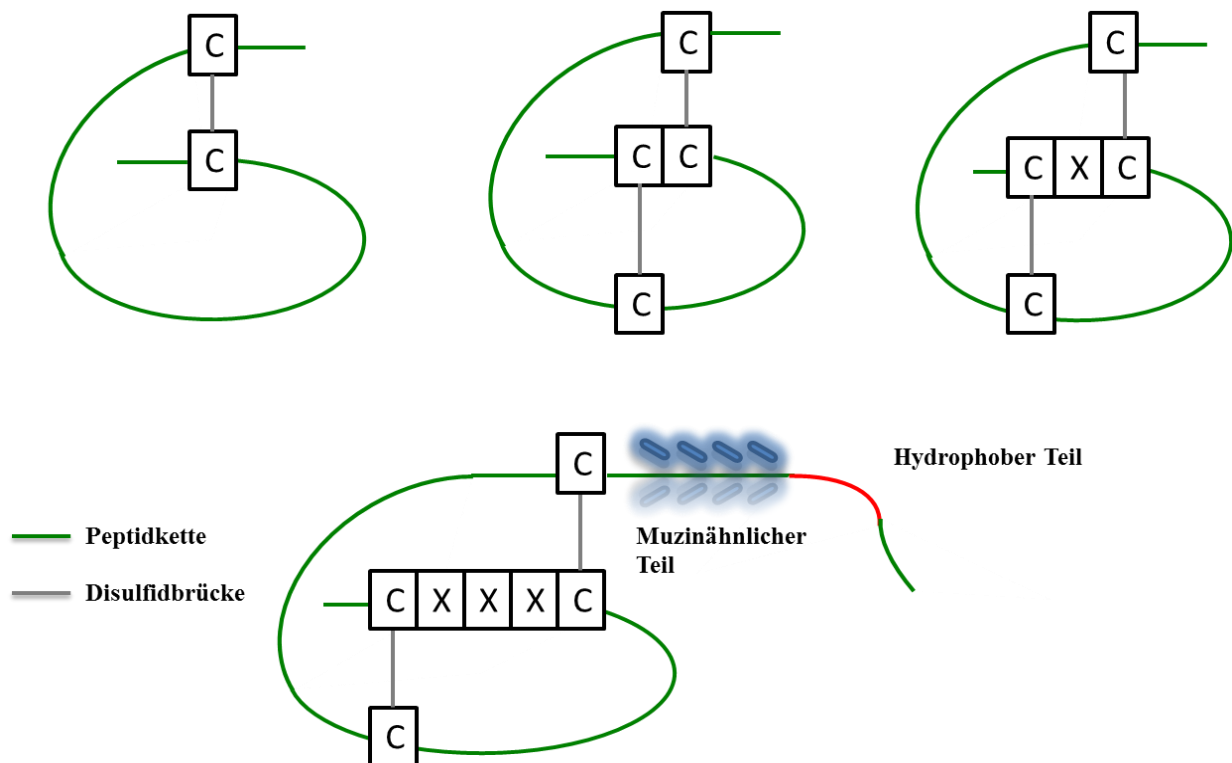
**(X)C Chemokine:** Die dritte Gruppe der Chemokine enthält ungewöhnlicherweise nur 2 Cysteine, wobei das Erste wieder aminoterminal lokalisiert ist und das Zweite dann nahe dem C-Terminus zu finden ist. Bisher wurden nur zwei Mitglieder dieser Subfamilie identifiziert: XCL1 (Lymphotaktin- $\alpha$ ) und XCL2 (Lymphotaktin- $\beta$ ) [27].

**CX<sub>3</sub>C Chemokine:** Diese Gruppe besteht im Moment aus nur einem einzigen Vertreter, CX<sub>3</sub>CL1, auch Fraktalkine genannt [28]. Wie schon bei den CXC Chemokinen steht das X für eine beliebige Aminosäure, in diesem Fall liegen jedoch drei Aminosäuren zwischen den beiden aminoterminalen Cysteinen. Auch das CX<sub>3</sub>C Chemokin enthält insgesamt 4 Cysteine.

In Abbildung 2 wird der Aufbau der Chemokine der vier Chemokinfamilien in einfacher schematischer Darstellung gezeigt.

**Abbildung 2: Einfache schematische Darstellung des Aufbaus der Chemokine der vier Chemokinfamilien (modifiziert nach Köhldai *et al.*, 2008)**

Extrem vereinfachte Darstellung der Cysteine (C) und der Disulfidbrücken im Hauptabschnitt der Peptidkette. Die zwischenliegenden Aminosäuren wurden analog der Nomenklatur mit X bezeichnet. Für CX<sub>3</sub>CL1 ist noch der sich anschließende mucinähnliche sowie der hydrophobe Teil der Peptidkette dargestellt.



Nahezu alle Chemokine liegen in löslicher Form vor und binden vorwiegend an Glykosaminoglykane (GAGs), also Proteoglykane wie Heparinsulfat oder Chondroitinsulfat, die auf den Oberflächen vieler Zellen exprimiert sind [1]. Einzig CXCL16 und CX<sub>3</sub>CL1 (Fraktalkine) liegen nicht in sezernierter Form vor, sondern werden durch eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert [29]. Strukturelle Analysen haben gezeigt, dass viele Chemokine in gelöster Form Dimere oder Tetramere bilden können. Einige wenige Chemokine wie beispielsweise CCL5 (RANTES) sind sogar in der Lage Aggregate von mehreren hundert Kilodalton zu formen. Zudem können Chemokine auch mit anderen Chemokinen heterooligomerisieren, selbst wenn sie nicht derselben Klasse angehören [1]. Es ist durch viele *in vitro*-Studien belegt, dass Chemokine als Monomere an ihre Rezeptoren binden und auch eine hohe Affinität zu diesen aufweisen [30-32]. Neuere Studien haben gezeigt, dass der Mechanismus der Oligomerisierung *in vivo* sehr wohl einen Einfluss auf die GAG-Bindung und damit auch auf die Funktion vieler Chemokine hat [33].

In Tabelle 1 sind alle derzeit bekannten humanen Chemokine gelistet, ihre Synonyme sowie Rezeptoren und Funktionen soweit bekannt. Auf die unterschiedlichen Funktionen soll im Folgenden eingegangen werden.

**Tabelle 1: Einteilung der humanen Chemokine, Synonyme und Rezeptoren**

I = inflammatorisch; H = homöostatisch; D = dual (H+I); U = unbekannt; A = antimikrobiell (gelistet sind Rezeptoren, Synonyme und Funktionen soweit bekannt)

Name	Synonyme	Funktion	Rezeptoren	Name	Synonyme	Funktion	Rezeptoren
<b>CC Chemokine</b>				<b>CXC Chemokine</b>			
CCL1	I-309, TCA-3	I	<b>CCR8</b> , DARC	CXCL1	Gro- $\alpha$ , GRO1, NAP-3	I	<b>CXCR2</b> , DARC
CCL2	MCP-1	I	<b>CCR2</b> , CCR4, CCR11, D6, DARC	CXCL2	Gro- $\beta$ , GRO2, MIP-2 $\alpha$	I	<b>CXCR2</b> , DARC
CCL3	MIP-1 $\alpha$	I	<b>CCR1</b> , CCR4, <b>CCR5</b> , D6	CXCL3	Gro- $\gamma$ , GRO3, MIP-2 $\beta$	I	<b>CXCR2</b> , DARC
CCL3L1	LD78 beta	I	<b>CCR1</b> , <b>CCR3</b> , <b>CCR5</b> , D6	CXCL4	PF-4	U	CXCR3, <b>CXCR3B</b> , DARC
CCL3L3	LD78 beta	I	CCR1, CCR3, CCR5	CXCL5	ENA-78	I	<b>CXCR2</b> , DARC
CCL4	MIP-1 $\beta$	I	CCR1, <b>CCR5</b> , CCR8, D6	CXCL6	GCP-2	I,A	<b>CXCR1</b> , <b>CXCR2</b> , DARC
CCL4L1	AT744.2	I	CCR1, CCR5	CXCL7	NAP-2, CTAPIII, $\beta$ -Ta, PEP	I	<b>CXCR1</b> , <b>CXCR2</b>
CCL4L2		I	CCR1, CCR5	CXCL8	IL-8, NAP-1, MDNCF, GCP-1	I	<b>CXCR1</b> , <b>CXCR2</b> , DARC
CCL5	RANTES	I	<b>CCR1</b> , <b>CCR3</b> , CCR4, <b>CCR5</b> , D6, DARC	CXCL9	MIG, CRG-10	I,A	<b>CXCR3</b> , CXCR3B, DARC
CCL6	C10, MRP-2	I		CXCL10	IP-10, CRG-2	I,A	<b>CXCR3</b> , CXCR3B, DARC
CCL7	MARC, MCP-3	I	<b>CCR1</b> , <b>CCR2</b> , <b>CCR3</b> , D6, DARC	CXCL11	I-TAC, $\beta$ -R1, IP-9	I,A	<b>CXCR3</b> , CXCR3B, <b>CXCR7</b> , DARC
CCL8	MCP-2	I	<b>CCR1</b> , <b>CCR2</b> , CCR3, <b>CCR5</b> , CCR11, D6,	CXCL12	SDF-1, PBSF	H	<b>CXCR4</b> , <b>CXCR7</b>
CCL9/CCL10	MRP-2, CCF18, MIP-1 $\gamma$	I		CXCL13	BCA-1, BLC	H	<b>CXCR3</b> , <b>CXCR5</b> , DARC
CCL11	Eotaxin	I	CCR3, CCR5, D6, DARC	CXCL14	BRAX, bolekin	I,A	Unknown
CCL12	MCP-5	I		CXCL15	Lungkine, WECH	I	
CCL13	MCP-4, NCC-1, Ck $\beta$ 10	I	<b>CCR1</b> , <b>CCR2</b> , <b>CCR3</b> , <b>CCR5</b> , <b>CCR11</b> , D6,	CXCL16	SRPSOX	U	<b>CXCR6</b>
CCL14	HCC-1, MCIF, Ck $\beta$ 1, NCC-2, CCL	H	CCR1, CCR3, CCR5, D6, DARC	CXCL17	DMC, VCC-1	U	Unknown
CCL15	Leukotactin-1, MIP-5, HCC-2, NCC-3	H	CCR1, CCR3	<b>(X)C Chemokine</b>			
CCL16	LEC, MTN-1, LMC, Ck $\beta$ 12	H	CCR1, CCR2, CCR5, CCR8, DARC, H4	XCL1	Lymphotactin $\alpha$ , SCM-1 $\alpha$ , ATAC	D	<b>XCR1</b>
CCL17	TARC, dendrokin, ABCD-2	D	CCR4, CCR8, D6, DARC	XCL2	Lymphotactin $\beta$ , SCM-1 $\beta$	D	<b>XCR1</b>
CCL18	PARC, DC-CK1, AMAC-1, Ck $\beta$ 7, MIP-4	H	PITPNM3, DARC	<b>CX<sub>3</sub>C Chemokine</b>			
CCL19	ELC, Exodus-3, Ck $\beta$ 11	H	<b>CCR7</b> , CCR11, CCRL2/ CRAM A/B	CX3CL1	Fractalkine, Neurotactin, ABCD-	I	<b>CX3CR1</b>
CCL20	LARC, Exodus-1, Ck $\beta$ 4	D,A	<b>CCR6</b>				
CCL21	SLC, 6CKine, Exodus-2, Ck $\beta$ 9, TCA-4	D	<b>CCR7</b> , CCR11				
CCL22	MDC, DC/ $\beta$ -CK	D	<b>CCR4</b> , D6				
CCL23	MPIF-1, Ck $\beta$ 8, MIP-3, MPIF-1	I	<b>CCR1</b> , <b>FPRL-1</b>				
CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2, Ck $\beta$ 6	I	<b>CCR3</b>				
CCL25	TECK, Ck $\beta$ 15	H	<b>CCR9</b> , CCR11				
CCL26	Eotaxin-3, MIP-4 $\alpha$ , IMAC, TSC-1	I	<b>CCR3</b>				
CCL27	CTACK, ILC, Eskine, PESKY, skinkine	H	<b>CCR10</b>				
CCL28	MEC	I,A	<b>CCR3</b> , <b>CCR10</b>				

### 2.2.2 Funktionen

Chemokine wurden bis vor kurzem in zwei verschiedene funktionelle Gruppen eingeteilt, die homöostatischen und die inflammatorischen (oder induzierbaren) Chemokine. Diese Schwarz/Weiss-Einteilung ist jedoch nicht immer zutreffend. Mit dem schnellen Fortschritt in der Chemokinforschung werden immer mehr funktionelle Daten bekannt und so kennt man inzwischen eine Reihe an Chemokinen, die sowohl homöostatische Wirkung als auch inflammatorische Komponenten haben. Zudem ist den Chemokinen seit wenigen Jahren noch eine weitere Funktion zuzuschreiben – die antimikrobielle Wirkung.

#### 2.2.2.1 Homöostatische Chemokine

Homöostatische Chemokine werden in der Regel konstitutiv exprimiert, das heisst sie werden produziert und sezerniert ohne dass ein bestimmter auslösender Reiz vorhanden sein muss. Viele dieser Chemokine spielen eine wichtige Rolle während der Ontogenese (im Besonderen bei Organogenese und Angiogenese) [2]. Die grundlegende Funktion ist jedoch das sogenannte Homing der Leukozyten, also die physiologische Migration von Leukozyten zu den jeweiligen lymphatischen Organen [34-36]. Produziert werden diese Chemokine vorwiegend in Thymus und anderen lymphatischen Geweben. Zwei Vertreter der Chemokine, die eine wichtige Rolle bei der Leukozytenmigration spielen, sind CCL19 und CCL21. Diese werden in lymphatischen Geweben freigesetzt und an endothelialen Oberflächen gebunden. Zirkulierende T-Zellen, die den entsprechenden Rezeptor tragen, in diesem Fall CCR7 (siehe 2.2.3), können so in die entsprechenden Gewebe einwandern [37]. Auch beim Priming von naiven T-Zellen und der Umverteilung von T-Effektorzellen im mucosalen Immunsystem haben homöostatische Chemokine eine wichtige Aufgabe. T-Effektorzellen exprimieren CCR9 und können so an CCL25 binden, das von Epithelzellen des Dünndarms produziert wird. Effektorlymphozyten die im Dickdarm geprägt wurden, werden auf ähnlichem Weg ins Darmgewebe gelenkt, allerdings reagiert hier CCL28 mit CCR10 [38, 39]. Die aktuell als homöostatisch bezeichneten Chemokine sind CCL14-16, CCL18, CCL19, CCL21, CCL25, CCL27, CXCL12 und CXCL13. Wie bereits angesprochen ist diese Klassifikation nicht als starre Einteilung zu sehen. So sind inzwischen eine Reihe von Chemokinen bekannt, die eine duale Funktion wahrnehmen (siehe Tabelle 1).

#### 2.2.2.2 Inflammatorische Chemokine

Hohe Konzentrationen inflammatorischer Chemokine werden als Reaktion auf entzündliche Prozesse im Körper produziert und bewirken so die Wanderung inflammatorischer Leukozyten zum Infektionsherd [3]. Gebildet werden diese Chemokine zum Beispiel von infizierten

Epithelzellen, hauptsächlich aber von aktivierten Immunzellen wie mononukleären Phagozyten. Die Aufgabe inflammatorischer Chemokine während einer akuten Infektion ist es, weitere Monozyten bzw. Makrophagen und neutrophile Granulozyten anzulocken. CXC Chemokine wirken hierbei bevorzugt auf neutrophile Granulozyten (CXCL8), während CC Chemokine hauptsächlich Chemotaxis bei Monozyten/Makrophagen auslösen. Natürlich sind nicht allein die Chemokine für das Einwandern von Immunzellen verantwortlich. Für die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten beispielsweise sind auch Adhäsionsmoleküle und Selektine (E-Selektin) notwendig [40]. Diese führen zum sogenannten Rollen der Leukozyten am Gefäßendothel und ermöglichen dadurch erst die Diapedese. Zu den rein als inflammatorisch bezeichneten Chemokinen gehören CCL1-13, CCL23, CCL24, CCL26, CCL28, CXCL1-3, CXCL5-11, CXCL14, CXCL15 und das CX<sub>3</sub>C Chemokin CX<sub>3</sub>CL1. Chemokine mit dualer Funktion können Tabelle 1 entnommen werden.

### 2.2.2.3 Antimikrobielle Chemokine

Im Jahr 2000 wurde erstmals eine antimikrobielle Aktivität bei Chemokinen am Beispiel von CXCL7 beschrieben. Die Entdeckung C-terminaler Deletionsmutanten dieses Chemokins, die im Folgenden Thrombozidin-1 (TC-1) und Thrombozidin-2 (TC-2) genannt wurden, wiesen sowohl antibakterielle als auch antimykotische Aktivität auf [41]. Thrombozidine sind *per definitionem* kleine antimikrobielle Proteine, die nach Thrombin-Aktivierung aus den alpha-Granula von Thrombozyten ausgeschüttet werden. Dass Thrombozyten eine ganze Reihe antimikrobiell wirksamer Peptide produzieren können und somit eine bedeutende Rolle in der Abwehr von intravasalen Pathogenen spielen, war schon einige Jahre zuvor gezeigt worden [42]. Nachdem der Beweis erbracht war, dass TC-1 und TC-2 zu den Chemokinen zu rechnen sind, wurden in den nächsten Jahren eine ganze Reihe von Chemokinen auf antimikrobielle Eigenschaften untersucht und inzwischen wurden auch für CXCL6, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL14, CCL20 und CCL28 unter inflammatorischen Bedingungen antimikrobielle Eigenschaften nachgewiesen [43-47].

### 2.2.3 Chemokinrezeptoren

Die klassischen Chemokinrezeptoren gehören ausnahmslos zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Diese stellt mit nicht weniger als 1000 Mitgliedern eine der größten Proteinfamilien dar. Fast alle GPCRs sind in der Lage nach Ligandenbindung ein heterotrimeres G-Protein zu aktivieren [48]. Die GPCRs lassen sich in drei verschiedene Gruppen einteilen:

Gs-gekoppelte Rezeptoren → Auslösen einer aktivierenden Signalkaskade

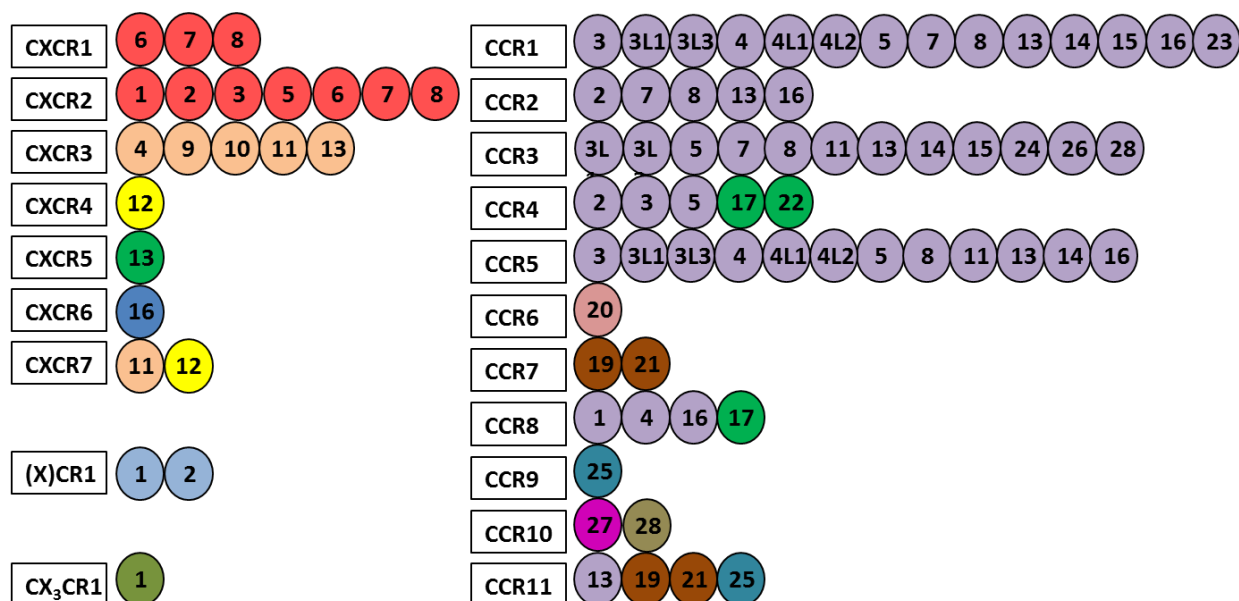
Gi-gekoppelte Rezeptoren → Auslösen einer inhibierenden Signalkaskade

Gq-gekoppelte Rezeptoren → Second Messenger lösen IP3/Phospholipase C Signalkaskade aus

Alle Chemokinrezeptoren sind Klasse A, also Rhodopsin-verwandte, GPCRs und haben im Normalfall eine aktivierende Wirkung auf die Zielzelle. Jeder Rezeptor bindet spezifisch nur Liganden derselben Chemokin-Familie, folglich gibt es CCRs, CXCRs, (X)CRs und CX<sub>3</sub>CRs, wobei R für Rezeptor steht. Dabei hat allerdings nicht jeder Ligand einen spezifischen Rezeptor. Vielmehr können an einen Rezeptor durchaus eine ganze Reihe verschiedener Liganden binden und so auch bei Ausfall eines Chemokins in vielen Fällen gleichermaßen dessen Aufgaben übernehmen. Die verschiedenen humanen Liganden und ihre Rezeptoren sind in Tabelle 1 aufgelistet, zur deutlicheren Veranschaulichung zeigt Abbildung 3 zusätzlich, welche Rezeptoren welche Liganden binden.

**Abbildung 3: Vereinfachtes Diagramm der humanen Rezeptoren und ihrer Liganden (modifiziert nach Zlotnik et al. [49])**

Die Chemokine sind nur durch ihre Nummer repräsentiert. Da jede Chemokin-Rezeptor-Familie nur Mitglieder der entsprechenden Chemokin-Familie binden kann wurde diese vereinfachte Darstellung gewählt. Die unterschiedlichen Farben bilden die chromosomale Lokalisation ab [49] - gleiche Farben bedeuten gleiche chromosomale Loci. Die Abbildung verdeutlicht, dass einzelne Rezeptoren bevorzugt Liganden binden, die in der selben Chromosomenregion liegen.



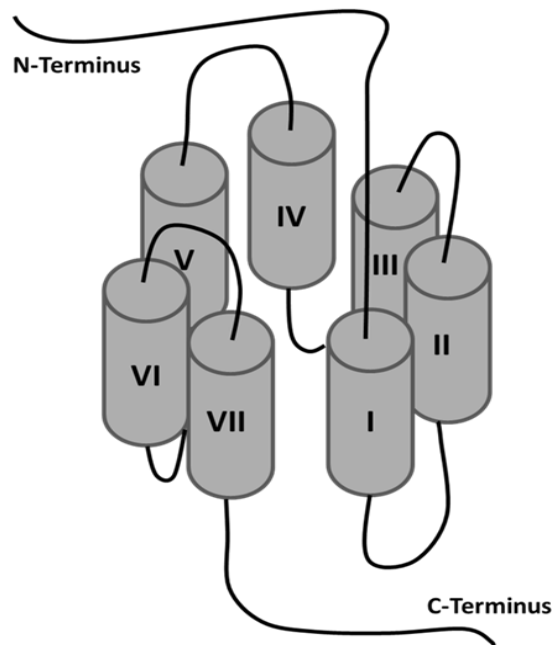
Ein charakteristischer Chemokinrezeptor hat eine hohe Affinität für Chemokine und muss bei Liganden-Bindung eine gerichtete Fortbewegung der Zielzelle bewirken [50]. Dies ist bei den sogenannten atypischen Chemokinrezeptoren nicht der Fall. Sie haben zwar eine hohe Affinität zu bestimmten Chemokinen, bewirken hingegen keine Chemotaxis. Auf die atypischen Chemokinrezeptoren wird später noch genauer eingegangen.

### 2.2.3.1 Struktur und Bindung

Chemokinrezeptoren haben, wie andere Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren auch, ein konserviertes DRY-Motif (Asparaginsäure – Arginin – Tyrosin) am zytoplasmatischen Ende des dritten Transmembran-Segments [51]. Der zytoplasmatische C-Terminus beinhaltet Threonin- und Serinreste die von G-Protein gekoppelten Rezeptor Kinasen (GRKs) phosphoryliert sein können. Die sieben Transmembran-Domänen durchspannen die Zellmembran und sind durch je drei intra- und extrazelluläre Schleifen untereinander verbunden. Der Aminoterminus liegt extrazellulär. Abbildung 4 zeigt die typische Tertiärstruktur eines Chemokinrezeptors.

**Abbildung 4: Tertiärstruktur eines typischen Chemokinrezeptors (nach Florian Busalt [7])**

Charakteristisch sind die sieben Transmembrandomänen, die die Zellmembran durchspannen. Der Aminoterminus liegt extrazellulär, der C-terminus bildet den zytoplasmatischen Anteil.



Der oft glykolysierte oder Tyrosin-sulfatierte N-Terminus ist bei einigen Chemokinrezeptoren, wie zum Beispiel CCR5, notwendig für eine hohe Bindungsaffinität [52]. Grundsätzlich ist der N-Terminus immer in die Rezeptor/Liganden-Bindung involviert, aber nicht zwingend notwendig für eine effektive Signaltransduktion [53]. Die Bindung eines Chemokins an seinen Rezeptor läuft in zwei aufeinanderfolgenden Schritten ab. Hierbei bindet der Hauptkörper des Chemokins, bestehend aus den drei antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblättern, an die extrazellulären Schleifen des Rezeptors, woraufhin eine Konformationsänderung des Aminoterminus des Chemokins erfolgt [54]. Erst danach kann dieser an weitere transmembranäre und extrazelluläre Bindungsstellen binden [55]. Konformationsänderungen



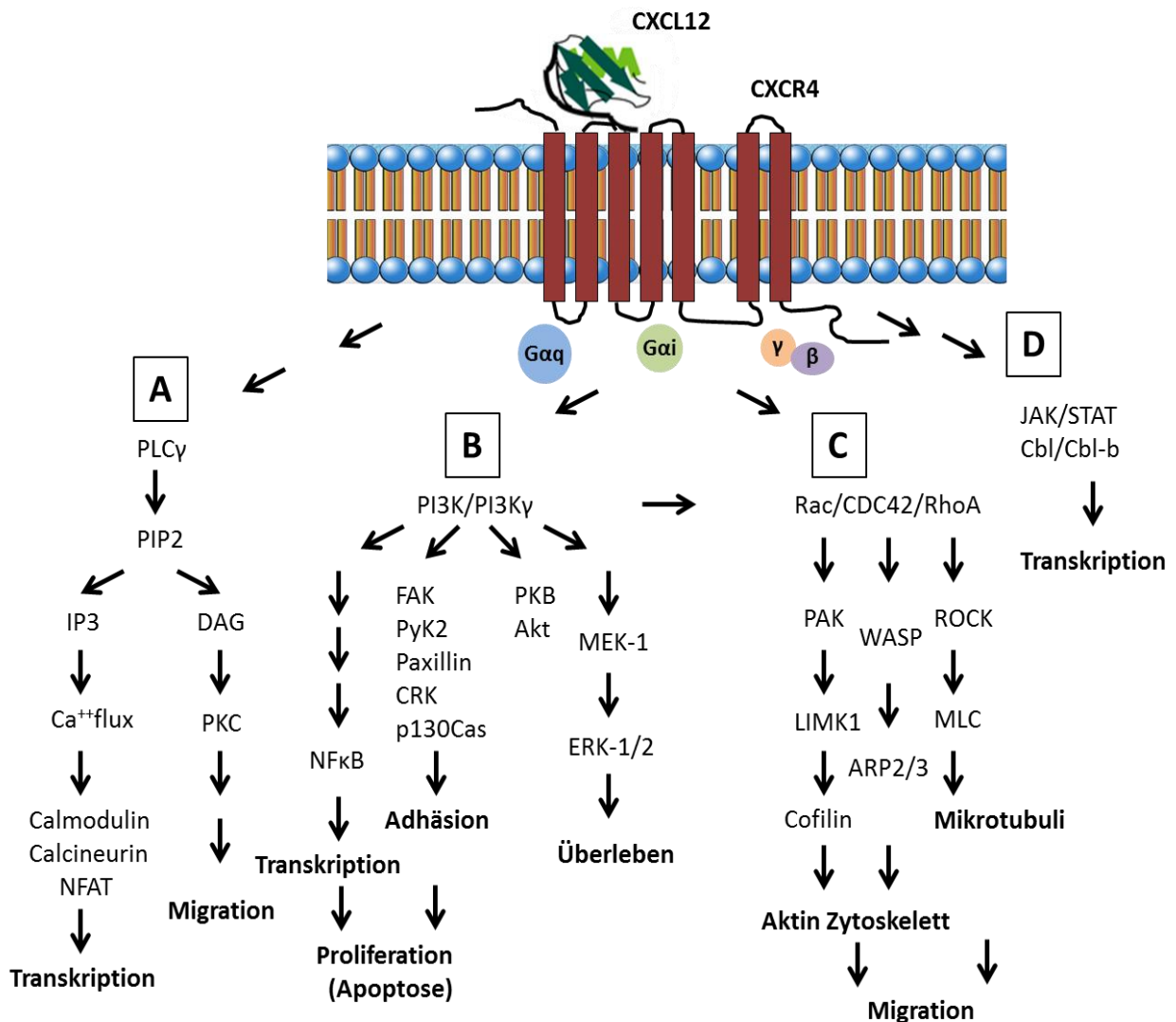
am zytoplasmatischen Teil des Rezeptors führen dann nach Umwandlung von GDP zu GTP zur Dissoziation der  $\alpha_i$ -Untereinheit des G-Proteins.

### 2.2.3.2 Signaltransduktion und Regulation

Die Komplexität der verschiedenen chemokininduzierten Signalwege ist Grundlage der verschiedenen Funktionen wie Chemotaxis, Adhäsion oder Proliferation sowie der Kontrolle von Vorgängen in der Genexpression. Die Induktion der verschiedenen Signalkaskaden wird hauptsächlich durch die Aktivierung und darauf folgende Dissoziation von  $G\alpha_i$  bewirkt, die speziell notwendig für das Auslösen der Chemotaxis ist [56]. Die  $G\alpha$ -Untereinheit ist mit nahezu allen Chemokinrezeptoren assoziiert. Zusätzlich führt eine Ligandenbindung aber auch zur Ablösung weiterer Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine,  $G\beta$  und  $G\gamma$ , was letztlich in einem  $IP_3$ -abhängigen Calcium-Influx resultiert. Je nach Vorhandensein bestimmter G-Proteine werden eine ganze Reihe verschiedener Signalkaskaden induziert. Die Aktivierung von *Phosphatidylinositol 3-Kinase* (PI3K) führt zur Aktivierung kleiner GTPasen wie *Rho*, *Rac* oder *Cdc42* [57], die zu Umbauvorgängen am Zytoskelett führen und die Zelle polarisieren [58]. Durch diese Pol-Bildung verändert sich das äußere Erscheinungsbild und die Symmetrie der Zelle die nun in der Lage ist gerichtete Bewegungen auszuführen. Neuere Studien haben auch eine Verbindung von PI3K und der *Extrazellulär-Signal Regulierten Kinase* (ERK) sowie der *Proteinkinase B* (PKB/Act) gezeigt, die an grundlegenden zellulären Prozessen wie Proliferation, Zelldifferenzierung und apoptotischen Vorgängen beteiligt sind [59]. Um Leukozyten zur Extravasion zu bewegen, ist eine weitere Modulation der Zelle notwendig die durch Integrin-Aktivierung bewirkt wird. Wie schon beschrieben rollen Leukozyten Selektin-vermittelt am Gefäßendothel entlang. Der Anreiz zur Anheftung an dieses und die darauf folgende Diapedese geben Integrine auf der Zelloberfläche der Leukozyten. Die notwendigen Konformationsänderungen dieser Integrine werden durch das sogenannte *inside-out-signalling* induziert [60]. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung der *Phospholipase C* (PLC) die in einer Erhöhung des zytoplasmatischen Calcium-Spiegels der Zelle resultiert. Das Calcium entstammt vorrangig aus Speichern des endoplasmatischen Reticulums. Erst im Anschluss werden sogenannte *Calcium-Release Activated Calcium Currents* (CRAC) aktiviert, die zu einem zusätzlichen Einstrom von Calcium aus dem extrazellulären Raum führen. Der Anstieg der Diacylglycerolkonzentration (DAG) führt wiederum zur Aktivierung kleiner GTPasen, in diesem Fall *Rap1* und *RHOA* [61], die letztlich über aktinbindende Proteine zu einer Konformationsänderung der Integrine auf der Zelloberfläche führen und damit die Diapedese ermöglichen.

**Abbildung 5: Signalkaskaden nach Chemokin-Bindung am Beispiel von CXCL12/CXCR4 (modifiziert nach Wu *et al.*, 2009 [62])**

Die Bindung eines Chemokins an seinen Rezeptor bewirkt eine Dissoziation der G-Protein-Untereinheiten. Dadurch werden unterschiedliche Signalkaskasen ausgelöst, die letztlich zu verschiedensten Veränderungen im Zellzyklus und dem Zytoskelett führen. Für die Migration wichtige Zwischenschritte sind die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die letztlich über die Aktivierung kleiner GTPasen zur Polarisierung der Zelle führen und sie damit beweglich machen.



Die Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wird durch sogenannte Regulatoren des G-Protein Signallings (RGS) bewirkt [63]. Binden diese an die G $\alpha$  Untereinheit wird die Hydrolyse von GTP zu GDP angeregt und die G $\alpha$  Untereinheit bildet zusammen mit G $\beta$  und G $\gamma$  wieder einen inaktiven Komplex. Diesem Vorgang geht, wie bei den meisten GPCRs, eine Desensibilisierung durch Phosphorylierung des C-terminalen Endes voraus [64], gefolgt von einer Internalisierung [65], die letztlich wieder zu einer Dephosphorylierung führt und den Rezeptor dann mithilfe der RGS wieder in einen aktivierbaren Zustand versetzt.

Da alle klassischen Chemokinrezeptoren typischen Klasse A GPCRs entsprechen, können die meisten Chemokinaktionen durch Pertussistoxin (PTX) gehemmt werden [66]. Unter

bestimmten Umständen kann diese Hemmung jedoch nicht vollständig sein was letztlich von den vorhandenen G-Protein Untereinheiten des entsprechenden Rezeptors abhängt [67].

### 2.2.3.3 Atypische Chemokinrezeptoren

Die bisher besprochenen klassischen Chemokinrezeptoren haben über diverse Signalkaskaden die Möglichkeit eine ganze Reihe von Funktionen auszuüben, jedoch sind sie immer in der Lage Chemotaxis auszulösen. Seit einiger Zeit sind allerdings Rezeptoren bekannt, die als atypische Rezeptoren bezeichnet werden und Chemokine binden, aber keine Chemotaxis auslösen können. Bei näherer struktureller Betrachtung hat sich herausgestellt, dass diesen Rezeptoren bestimmte Motive fehlen wie beispielsweise das ansonsten hochkonservierte DRY-Motiv (Asp-Arg-Tyr). Obwohl sie strukturell den GPCRs zugeordnet werden können, ist keine Signalweiterleitung über G-Proteine möglich. Der am besten beschriebene atypische Chemokinrezeptor ist D6 (CCR10) [68, 69], der als sogenannter *Decoy*-Rezeptor agiert um Chemokine wegzufangen und so überschießende Immunreaktionen zu verhindern [70]. Andere *Decoy*-Rezeptoren sind beispielsweise CXCR7 und CCX-CKR [71], die interessanterweise allerdings hauptsächlich homöostatische Chemokine binden. Einige wenige atypische Chemokinrezeptoren wirken auch als Transportmoleküle um Chemokine gezielt in bestimmten Bereichen zu konzentrieren. Ein typischer Vertreter dieser Klasse ist der sogenannte *Duffy Antigen Receptor for Chemokines* (DARC) [72]. Dieser bindet ausschließlich inflammatorische Chemokine und wird von Erythrozyten exprimiert, reguliert somit die Chemokinkonzentration im Blut [73]. Urprünglich wurde er als Rezeptor von *Plasmodium spp.* und somit als Eintrittspforte für Malariaerreger identifiziert [74, 75]. Des Weiteren befindet sich DARC auch auf diversen Gefäßendothelien und kann Chemokine durch Transzytose an der luminalen Seite präsentieren um endothelial entlangrollende Leukozyten zur Diapedese anzuregen [76].

## 2.3 Das Chemokinsystem beim Huhn

In vielerlei Hinsicht wird das Immunsystem der Vögel als einfacher und weniger ausgereift betrachtet als das der Säuger. Das Immunsystem des Vogels ist evolutionär um einiges älter als das der Säuger. Vögel besitzen keine Lymphknoten, beim Säuger ein wichtiger Ort der Antigenpräsentation, und haben kein IgE oder IgD. Zudem verfügen sie über ein sehr viel kleineres Repertoire an Zytokinen und Chemokinen. Deshalb wird gerade für die Chemokine eine größere Funktionsvielfalt des einzelnen Chemokins aber auch eine geringere Reaktionsflexibilität des gesamten Chemokinsystems vermutet [9]. Jedoch gibt es auch bei Vögeln spezialisierte lymphatische Gewebe, die zum Teil beim Säuger nicht existent sind, wie beispielsweise die *Bursa Fabricii*.

Die Sequenzierung des Hühnergenoms im Jahre 2004 hat der aviären Immunologie ganz neue Türen geöffnet [77, 78]. Die etwa 23000 identifizierten Gene lassen nun phylogenetische Vergleiche zu und so wurden in den letzten Jahren auch im Bereich der Hühnerchemokine gewisse Fortschritte erzielt. Aufgrund der immer noch sehr verwirrenden Nomenklatur wurden in dieser Arbeit ausschließlich Bezeichnungen verwendet, die von Kaiser *et al.* eingeführt wurden [4].

Insgesamt wurden im Hühnergenom 24 Chemokin-codierende Gene identifiziert: 1 (X)CL, 15 CCL, 8 CXCL und 1 CX<sub>3</sub>CL [4]. Für CX<sub>3</sub>CL1 wurde ebenso wie für (X)CL1 ein direktes Ortholog gefunden, das auch beim Huhn genauso bezeichnet wurde – chCX<sub>3</sub>CL1 und ch(X)CL1. Bei den CXC Chemokinen verhält es sich etwa anders. In der äquivalenten Region von Chromosom 4, die beim Menschen die Chemokine CXCL1 bis CXCL8 codiert, liegen beim Huhn nur drei CXCL-codierende Gene vor. Die beiden ersten sind schon länger bekannt und gelten als IL-8 Verwandte [6]: chCXCLi1, das auch als *K60* bekannt ist [5] und chCXCLi2, welches auch den Namen *Chemotactic And Angiogenic Factor* (chCAF) trägt, oft aber auch als *9E3/CEF4 Gene Product* bezeichnet wird. [6, 79]. Das dritte Chemokin dieser Reihe, chCXCLi3, wurde bisher noch nicht näher charakterisiert. Das „i“ in der Namensgebung soll allgemein die Rolle als inflammatorisches Chemokin hervorheben. Es konnten zudem fünf weitere CXC Chemokine identifiziert werden, die hauptsächlich homöostatische Funktionen ausüben. Die Orthologe zu CXCL12 und CXCL14 wurden auch beim Huhn so benannt, für CXCL13 existieren im Huhn allerdings drei Varianten, die chCXCL13L1-3 benannt wurden [4]. Für die Chemokine chCXCL12 und chCXCR13 wurde erst kürzlich eine Beteiligung an der Einwanderung von B-Zellen in die *Bursa Fabricii* beschrieben [7].

Für vier der CCL Chemokine konnten ebenfalls direkte Orthologe identifiziert werden, die analog chCCL17, chCCL19, chCCL20 und chCCL21 genannt wurden. Die restlichen zehn lassen sich in zwei Gruppen aufteilen: Zum einen die *Macrophage Inflammatory Protein Family* (MIP-Familie), die beim Menschen sieben Vertreter zählt - beim Huhn allerdings nur vier, die chCCLi1-4 genannt wurden. Zum anderen die *Monocyte Chemoattractant Protein Family* (MCP-Familie), die beim Huhn konsequenterweise chCCLi5-10 genannt wurden [4]. Beim Menschen zählt diese Familie ebenfalls sechs Mitglieder.

Untersuchungen über antimikrobielle Wirkungen von aviären Chemokinen oder das Vorkommen von Thrombozidinen beim Huhn liegen bisher nicht vor.

Betrachtet man die Rezeptoren, so lassen sich insgesamt nur acht direkte Orthologe identifizieren, davon drei CXC Rezeptoren (CXCR1, CXCR4 und CXCR5) sowie fünf CC Rezeptoren (CCR4, CCR6, CCR7, CCR8 und CCR9). Vermutliche Orthologe der restlichen

Rezeptoren, nämlich CCR1-3 und CCR5, sind im Hühnergenom allerdings ebenfalls zu finden. Insgesamt liegen im Hühnergenom drei verschiedene CCR-Gene in äquivalenten Regionen der humanen und murinen Chromosomen 3 und 9. Diese wurden im Folgenden chCCRa, chCCRb und chCCRc benannt. chCCRa und chCCRb liegen in Bereichen, die im humanen Genom CCR1, CCR2, CCR3 und CCR5 codieren, chCCRc wird mit CCR8 assoziiert [9].

## 2.4 Das aviäre CC Chemokin K203

### 2.4.1 Eingruppierung

Das CC Chemokin K203, das in der aviären Chemokin-Nomenklatur auch den Namen chCCLi3 trägt, wurde erstmals bei mRNA-Analysen LPS-stimulierter HD11 Zellen, einer Hühner-Makrophagen-Linie, nachgewiesen [8]. Das K203-Gen zeigt 46% Sequenzübereinstimmung mit dem humanen *Macrophage Inflammatory Protein 1 $\beta$*  (MIP-1 $\beta$ ) und 44% zu humanem *Macrophage Inflammatory Protein 1 $\alpha$*  (MIP 1 $\alpha$ ) [8]. Codiert wird K203 auf dem Chromosom 19 des Huhnes, wobei auf diesem Chromosom das exakte Codierungsmuster noch immer unklar ist [9]. Insgesamt werden dort wahrscheinlich 10 CCL Chemokine codiert die in zwei verschiedenen Clustern vorliegen. K203 liegt zusammen mit zwei anderen *MIP 1 $\beta$ -like*-Proteinen die als chCCL4 [80, 81] und ah294 [82] (chCCLi2 und chCCLi4) beschrieben wurden, sowie einem noch nicht näher charakterisierten CCL Vertreter (chCCLi1) in einem distinkten Bereich des Chromosoms 19. Das andere Cluster beinhaltet 6 weitere CC Chemokine. Vergleicht man diese Cluster mit der Lokalisation auf humanen oder murinen Chromosomen, so findet man auf dem humanen Chromosom 17 und dem murinen Chromosom 11 ganz ähnliche Cluster, die dort die sog. MIP- und MCP-Familien codieren [9]. Homologien und eventuelle Orthologe der CC Chemokine des Huhnes werden in der Literatur kontrovers diskutiert [83, 84]. Allgemeine Einigkeit besteht nur im Hinblick auf chCCLi4, das klare Homologie zum CCL5 der Säuger aufweist. Für chCCLi3, also K203, wird nach mehreren Re-Evaluationen des Genoms angenommen, dass es sich um ein Ortholog zu humanem CCL16 handeln könnte [9].

### 2.4.2 Rezeptoren von K203

Die bisher im Menschen identifizierten elf CC Rezeptoren haben im Hühnergenom nur fünf direkte Orthologe, CCR4, CCR6, CCR7, CCR8 und CCR9. Diese werden analog zum humanen Ortholog nummeriert. Die Rezeptoren CCR1-3 und CCR5 werden sowohl im humanen als auch im murinen Genom auf den Chromosomen 3 und 9 codiert. Im Hühnergenom liegt in der äquivalenten Region ein Cluster von drei CCR Genen. Zwei davon clustern direkt mit den genannten CCRs im Säugergenom. Das dritte Gen liegt phylogenetisch aber viel näher bei

CCR8, von dem ein direktes Ortholog bekannt ist. Diese drei bisher unbekannten Rezeptoren wurden chCCRa, chCCRb und chCCRc genannt [9]. Orthologe zu humanem CCR10 und CCR11 wurden bisher nicht identifiziert.

Funktionelle Daten zu chCCRa-c existieren bisher nicht, jedoch sind einige wenige Expressionsdaten auf mRNA Ebene bekannt. So wird chCCRa in diversen lymphoiden Organen wie Bursa, Milz, Thymus, Knochenmark, Caecaltonsillen sowie Teilen des Darms und von Monozyten exprimiert. Auch chCCRc zeigt ein ähnliches Expressionsprofil, allerdings war keine Expression in Knochenmark oder Monozyten nachweisbar. Jedoch wurde chCCRc-Expression zusätzlich in Muskel und Gehirn gezeigt [9]. Zur Expression von chCCRb liegen bislang keine Daten vor.

### 2.4.3 K203 Expression *in vitro* und *in vivo*

Obwohl das Chemokin K203 schon vor über zehn Jahren entdeckt wurde, ist über seine Funktion nahezu nichts bekannt. Es existieren einige Expressionsstudien, bei denen K203 aufgefallen ist, jedoch wurde diesem Chemokin nie weitere Beachtung zuteil.

Wie schon weiter oben beschrieben wurde K203 ursprünglich in LPS-stimulierten HD11 Zellen, einer Hühner-Makrophagenlinie, entdeckt [8]. In Untersuchungen zur mukosalen Immunantwort des Huhnes auf *Eimeria* Infektionen fiel auf, dass die Expression von K203 in Darmgewebe nach wenigen Tagen enorm anstieg. Intraepitheliale Lymphozyten zeigten sogar eine 1756-fache Hochregulierung [10, 11]. Nach einer Infektion mit *Marek's Disease Virus* (MDV) konnte nach wenigen Tagen ein erhöhtes Expressionsniveau von K203 in der Milz beobachtet werden [85]. Untersuchungen zur Entwicklung des Darmimmunsystems beim Huhn belegen, dass K203 besonders in Duodenum und Colon bereits zwei Tage nach Schlupf induziert wird [86].

Am Besten untersucht ist sicherlich die K203-Antwort auf eine Infektion des Huhnes mit *Salmonella spp.*. Mehrere Studien widmeten sich dem Nachweis von K203 sowohl *in vitro* bei infizierten Makrophagen [87] als auch *in vivo* in Darmgewebe und Ovidukt [12-14]. All diese Expressionsdaten belegen, dass K203 bei Salmonelleninfektion zu den am stärksten induzierten Genen gehört. Umfassende Mikroarray-Analysen Salmonellen-infizierter primärer Hühnermakrophagen stützen diese These [14].

### 2.4.4 CCL16 des Menschen

Das Chemokin CCL16, in der Literatur häufig auch als *Liver-Expressed Chemokine* (LEC) bezeichnet, wurde in der Maus bislang nur als Pseudogen identifiziert, das aufgrund von mehreren Deletionen, Insertionen und Basenwechseln nicht funktionell ist [17]. CCL16 wird

konstitutiv von Hepatozyten sowie in Milz und Thymus exprimiert und ist ein *Low-Affinity*-Ligand für CCR1, CCR2, CCR5 und CCR8 [88, 89]. Zudem wird CCL16 auch als funktioneller Ligand des *Histamine Receptor Type 4* (H4) beschrieben, der auf eosinophilen Granulozyten und Mastzellen zu finden ist [90].

Das Protein zeigt Sequenzhomologien von nur 19-38% zu anderen humanen CC Chemokinen mit der höchsten Homologie zu CCL14 [91]. Über die biologische Aktivität von CCL16 ist aufgrund fehlender Detailstudien noch sehr wenig bekannt. Nach aktuellem Kenntnisstand induziert CCL16 Chemotaxis von Monozyten und Lymphozyten, nicht aber von neutrophilen Granulozyten [92, 93]. Aufgrund der konstitutiven Expression in Hepatozyten wird angenommen, dass CCL16 eine Rolle in der homöostatischen Zellmigration der Leber spielt [88]. Zudem ist bei adulten, gesunden Menschen auch eine hohe Konzentration von CCL16 im Blutplasma nachgewiesen worden. Dies hat die Überlegung angeregt, dass die Präsenz dieses Chemokins im Blutplasma die Bindung von pro-inflammatorischen Chemokinen wie MIP-1 $\alpha$  oder RANTES an CCR1-exprimierende Leukozyten kompetitiv hemmen könnte [88].

Vor allem Makrophagen werden durch CCL16 in ihrem Expressionsmuster beeinflusst. Es konnte eine hohe Expression von *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1), TNF- $\alpha$  und Fas-Ligand sowie diversen costimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 oder CD40 beobachtet werden, die einerseits die Phagozytose und die Beseitigung von Antigen verstärken und weitere Monozyten aus dem Blutstrom anlocken, andererseits aber auch eine starke zytolytische Aktivität in unreifen T-Zellen stimulieren. Überexpression von TNF- $\alpha$  und Fas-Ligand verstärkt zudem auch die Aktivität reifer cytotoxischer T-Zellen [94]. Auch die Reifung von *Monocyte-Derived Dendritic Cells* (MoDCs) scheint durch CCL16 angeregt zu werden, was indirekt auch die Differenzierung unreifer T-Zellen zu Th1 Zellen stimuliert [95].

IFN $\gamma$ , bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und IL-10 konnten als potente Induktoren von CCL16 identifiziert werden [92, 96]. Diese Induktion wurde vor allem bei Monozyten/Makrophagen sowie in abgeschwächter Form auch bei NK-Zellen und T-Zellen beobachtet. Es ist interessant, dass IL-10 die Expression dieses Chemokins hochreguliert, da es üblicherweise regulierend bzw. hemmend auf Abwehrvorgänge des Immunsystems wirkt und somit die Expression von Chemokinen eher unterdrückt. Diese Beobachtungen unterstützen die These, dass CCL16 eventuell kompetitiv an bestimmte Chemokinrezeptoren bindet um diese für andere Chemokine zu blockieren [88].

## 2.5 Salmonelleninfektion des Huhnes

### 2.5.1 Taxonomie und Vorkommen

Bisher wurden über 2500 *Salmonella* Serovare beschrieben die sich nach dem Kauffmann-White-Schema durch das Vorkommen von unterschiedlichen O und H-Antigenen unterscheiden lassen. Im Moment existieren zwei *Salmonella* Spezies, *S. bongori* und *S. enterica*. Von *S. enterica* sind des Weiteren noch sechs Subspezies beschrieben die wiederum jeweils eine Gruppe bilden.

Gruppe I: *S. enterica* Ssp. *enterica*

Gruppe II: *S. enterica* Ssp. *salamae*

Gruppe III: *S. enterica* Ssp. *arizonae*

Gruppe IV: *S. enterica* Ssp. *diarizonae*

Gruppe V: *S. enterica* Ssp. *houtenae*

Gruppe VI: *S. enterica* Ssp. *indica*

Für Vögel sind nur einige wenige Serovare von pathologischer Bedeutung. *S. Pullorum* (Gruppe I), der Erreger der sogenannten weißen Kükenruhr und *S. Gallinarum* (Gruppe I), der Erreger des Hühnertyphus sind dabei sicherlich die Serovare mit der höchsten Pathogenität. Beide Erkrankungen sind von hoher Mortalität gekennzeichnet und sind auch heute noch in einigen Teilen der Welt Grund für hohe wirtschaftliche Verluste. Im europäischen Raum kommen diese Geflügelseuchen heute nur noch selten vor, die meisten Ausbrüche werden bei Wildgeflügel verzeichnet.

Für die Geflügelwirtschaft sind besonders im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit die Serovare von Interesse, die zoonotisches Potential haben. Hauptursache für Salmonellosen beim Menschen sind *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* gefolgt von diversen weiteren Serovaren der Gruppe I [15]. Obwohl die Anzahl der Erkrankungen in den Jahren 2004 bis 2009 nahezu halbiert werden konnte, werden jedes Jahr europaweit immer noch über 100.000 gemeldete Salmonellenerkrankungen verzeichnet, wobei die Dunkelziffer mit Sicherheit sehr viel höher liegt [15]. Hauptinfektionsquellen sind immer noch Geflügelfleisch, Eier und Eiprodukte [16].

### 2.5.2 Infektionswege und Klinik

Das Huhn kann sich sowohl auf horizontalem als auch auf vertikalem Wege infizieren. Das Haltungssystem spielt dabei eine große Rolle. Tiere in Käfighaltung sind mit nur knapp 2% weit weniger oft infiziert als zum Beispiel Tiere aus Freilandhaltung mit ca. 50% [97, 98]. Dies ist besonders im Hinblick auf die Eiproduktion von Bedeutung, da Salmonellen in der Lage sind,



die Eischale zu penetrieren [16]. In der Einstreu können Salmonellen unter Umständen über ein halbes Jahr persistieren [99, 100].

Kontamination von Trinkwasser und Futter kann durch Nippeltränken und entsprechende Fütterungssysteme heute sehr gut vermieden werden. Die Kontrolle von Vektortieren wie Ratten und Mäuse ist ebenfalls sehr wichtig. Auch Katzen, Hunde oder Füchse können durch ihren Kot Salmonellen in die Betriebe einbringen [99].

Eine vertikale Infektion des Eis kann im Prinzip in jedem Abschnitt des Genitalapparates stattfinden. Es wurde gezeigt, dass *S. Enteritidis* in der Lage ist, im Geschlechtstrakt zu persistieren und sich dort der Immunantwort des Huhnes zu entziehen [101, 102].

Da die in der Geflügelwirtschaft bedeutenden zoonotischen Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* keine geflügelspezifischen Serovare sind, besteht für die Betriebe das Problem, Infektionen überhaupt zu erkennen. Adulte Tiere zeigen meist überhaupt keine Symptome, manchmal kann ein Rückgang der Eiproduktion beobachtet werden [103]. Sehr junge Tiere, besonders Eintagsküken können allerdings erkranken, wenn sie mit hohen Dosen infiziert werden [104]. Diese Tiere sind oft apathisch und anorektisch, haben Fieber und starke Durchfälle die unter Umständen bis zum Tod führen können. Pathologisch zeigen sich katarrhalische und hämorrhagische Darmentzündungen sowie nekrotische Veränderungen von Leber, Milz, Nieren und dem Myokard.

Wie Salmonellen genau in den aviären Organismus gelangen ist zum heutigen Zeitpunkt noch unklar. Die größte Anzahl von Salmonellen kann allerdings im Caecum von infizierten Tieren nachgewiesen werden. Dort durchqueren sie das mukosale Epithel und treffen anschließend auf darmresidente Makrophagen und unreife dendritische Zellen [105]. Über sogenannte *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) werden dann bestimmte Muster, die sogenannten *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP) erkannt. Untersuchungen zur Kinetik der Salmonelleninfektion im Huhn konnten zeigen, dass nach 24 Stunden IL-8, IL-12, iNOS, IL7R $\alpha$  und LITAF verstärkt exprimiert wurden. Für IFN $\gamma$ , MIP-1 $\beta$  und IL-18 konnte nach 36 bzw. 48 Stunden ein deutlicher Expressionsanstieg verzeichnet werden [106]. Die Expression des Chemokins K203 wurde in dieser Studie nicht untersucht. Aufgrund dieser Beobachtungen wird angenommen, dass die angeborene Immunantwort beim Huhn eine große Rolle in der Elimination nicht-wirtsspezifischer Salmonellen spielt. Da Salmonellen in der Lage sind intrazellulär in Makrophagen zu überleben, können sie auf diesem Weg weiter in Leber und Milz gelangen und bei schwerer Infektion auch systemisch werden [107].

### 3 ZIELSETZUNG

Für die Kontrolle von Infektionserkrankungen sind genaue Kenntnisse der Immunreaktion des Wirtstieres unabdingbar. Im Hinblick auf das Immunsystems des Huhnes besteht allerdings in vielen Bereichen noch erheblicher Forschungsbedarf.

Das Chemokinsystem des Huhnes wurde inzwischen auf genomischer Ebene charakterisiert und aufgrund dieser Daten wurden potentielle Homologe zu Säugerchemokinen beschrieben. Jedoch fehlen bei fast allen aviären Chemokinen funktionelle Daten um diese Homologien zu bestätigen bzw. widerlegen zu können oder einfach grundsätzliche Funktionsweisen dieser Chemokine zu verstehen.

Für das schon über 10 Jahre bekannte Chemokin K203 liegen bisher keine funktionellen Studien vor. Diverse Expressionsstudien deuten darauf hin, dass es eine wichtige Rolle sowohl bei bakteriellen als auch viralen und parasitären Erkrankungen zu spielen scheint.

Ziel dieser Arbeit war es daher das CC Chemokin K203 (chCCLi3) funktionell näher zu charakterisieren um Rückschlüsse über seine immunologische Rolle in der Abwehr von Infektionen zu erhalten.

Durchflusszytometrische Bindungsstudien sollten zeigen, welche Zellen Rezeptoren für K203 exprimieren um einen Schluss auf eventuell während einer Infektion angelockte Zellen zuzulassen. Die in der Literatur beschriebenen möglichen Rezeptoren sollten auf K203-Bindung untersucht werden und der Nachweis der Expression in verschiedenen Zellpopulationen sollte erbracht werden. Chemotaxis-Assays hatten zum Ziel die Induzierbarkeit von Migration anhand einer K203-positiven Zelllinie zu zeigen. Zudem sollte die Kinetik der K203 Expression im Caecum bei einer Salmonelleninfektion des Huhnes mit dem humanpathogenen Serovar *S. Enteritidis* über einen längeren Zeitraum bestimmt werden.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Tiere, Tierhaltung und Infektion

#### 4.1.1 Hühner

Für die Infektionsversuche mit *Salmonella* Enteritidis wurden *Specific pathogen free* (SPF) Eier der Linie White Leghorn im *Federal Research Institute for Animal Health* des Friedrich-Löffler-Instituts in Jena unter Standardbedingungen bebrütet und geschlüpft. Freier Zugang zu Trinkwasser sowie antibiotika- und zusatzfreiem kommerziellem Futter in Pulverform war jederzeit gewährleistet. Nicht-infizierte Tiere wurden isoliert von Salmonellen-infizierten Tieren gehalten. Die Tierversuche wurden unter der Aufsicht des Thüringer Landesamtes für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (Tierversuchsnummer: 04-01/01) durchgeführt.

Die Versuche zur *Campylobacter*-Infektion wurden am *Department of Infection Biology* des *Institute of Infection and Global Health* der *University of Liverpool* durchgeführt. Hierfür wurden Broiler, bezogen von der P.D. Hook Hatchery, Oxford, UK, direkt nach dem Schlupf in zwei Gruppen zu je 10 Tieren aufgestellt. Freier Zugang zu Protein-basiertem Pellet-Alleinfuttermittel und frischem Trinkwasser war zu jeder Zeit gewährleistet. Dieser Tierversuch wurde unter dem Code „ZIPP12“ angemeldet und von der zuständigen Regierungsbehörde unter der Nummer PPL40/3652 lizenziert.

Für alle weiteren Versuche wurden Eier der Linie M11 (FLI, Mariensee) am Institut für Tierphysiologie der LMU München bebrütet und geschlüpft. Die Haltung der Tiere erfolgte in Kleingruppen zu fünf bis acht Tieren in Volieren mit 2m<sup>2</sup> Grundfläche. Diese waren mit Sitzstangen, Sandbädern und Stroheinstreu ausgestattet. Handelsübliches Pellet-Alleinfuttermittel für Legehennen und frisches Trinkwasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

#### 4.1.2 Mäuse

Für die Herstellung der monoklonalen Antikörper wurden Balb/c-Mäuse von der Firma Charles River, Köln bezogen und im Alter von 26 Tagen am Institut für Tierphysiologie eingestallt. Die Haltung der Mäuse erfolgte in Kleingruppen zu drei bis fünf Tieren. Sämtliche Käfige waren tierartgerecht mit Beschäftigungsmaterial und Versteckmöglichkeiten ausgestattet. Pellet-Alleinfuttermittel sowie frisches Wasser standen den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung.

Die Immunisierungen der Mäuse erfolgten mit Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern unter der Anzeigennummer Az.: 55.2-1-54-2532.6-12-09

#### 4.1.3 Kaninchen

Die zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums benötigten Kaninchen der Rasse *New Sealand White* wurden ebenfalls von der Firma Charles River, Köln bezogen und in Kleingruppen zu zwei bis vier Tieren am Institut für Tierphysiologie gehalten. Die Fütterung erfolgte mit handelsüblichem Alleinfuttermittel in Pelletform. Die Tiere hatten zu jeder Zeit Zugang zu frischem Trinkwasser.

Die Genehmigung der Immunisierungen erfolgte durch die Regierung von Oberbayern unter der Nummer Az.: 55.2-1-54-2532.6-12-09

#### 4.1.4 Infektion der Hühner mit *Salmonella* Enteritidis

(durchgeführt am Friedrich-Löffler-Institut, Jena durch Dr. Angela Berndt)

##### Material:

*Salmonella enterica* ssp. *enterica* Stamm Enteritidis 147 (SE147) <sup>1</sup>

(Lagerung bei -20°C)

*Nutrient Broth* <sup>2</sup>

*Nutrient Agar* <sup>2</sup>

**Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2**

8,00g Natriumchlorid (NaCl) <sup>3</sup>

1,45g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) <sup>3</sup>

0,2g Kaliumchlorid (KCl) <sup>3</sup>

0,2g Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) <sup>3</sup>

ad 1000ml Aqua dest.

Der invasive Wildtypstamm *S. Enteritidis* 147 (SE147) wurde in *Nutrient Broth* kultiviert und die Infektionsdosis von  $1 \times 10^4$  CFU/Tier wurde mittels einer Messung der Extinktion bei 600nm beziehend auf den Kalibrationswert berechnet. Zusätzlich wurde zur Kontrolle des Inokulums ein Plattenausstrich auf *Nutrient Agar* angefertigt und am nächsten Tag ausgezählt. Die entsprechende Bakterienzahl wurde nach Zentrifugation bei 300xg für 10 Minuten bei Raumtemperatur in PBS pH 7,2 aufgenommen, so dass 0,1ml etwa  $1 \times 10^4$  CFU enthielten. Diese Menge wurde Eintagsküken oral verabreicht, die Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Sowohl die Infektions- als auch die Kontrollgruppe bestand aus jeweils 3 Tieren pro geplantem Organentnahmezeitpunkt (2hpi, 5hpi, 1,2,3,8,13 und 50dpi). Diese wurden nach Schlagbetäubung durch Blutentzug getötet. Die

weiteren Untersuchungen des entnommenen Caecalgewebes werden unter den Punkten 4.4 und 4.10 besprochen.

#### 4.1.5 Infektion der Broiler mit *Campylobacter jejuni*

(durchgeführt an der University of Liverpool durch Dr. Paul Wigley)

##### Material:

*Campylobacter jejuni* Stamm M1 <sup>1</sup>

(Lagerung bei -80°C)

*Columbia Blood Agar* mit 5% defibrinisiertem Pferdeblut <sup>2</sup>

*Müller-Hinton-Broth* <sup>2</sup>

*Maximal Recovery Diluent* <sup>2</sup>

*Campylobacter jejuni* Stamm M1 wurde auf *Columbia Blood Agar* für 48 Stunden bei mikroaeroben Bedingungen (80% N<sub>2</sub>, 12% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> und 3% H<sub>2</sub>) bei 41,5°C angezüchtet. Aus den Kolonien wurden Flüssigkulturen angelegt die in *Müller-Hinton-Broth* für 24 Stunden ebenfalls bei 41,5°C inkubiert wurden. Am Lebenstag 22 wurde eine der beiden Broilergruppen oral mit 0,2ml dieser Bakteriensuspension infiziert. Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge steriler *Müller-Hinton-Broth*. Zur Kontrolle des Inokulums wurden Serien-Verdünnungsreihen in *Maximal Recovery Diluent* angelegt und in Triplets zu je 20µl auf *Columbia Blood Agar* ausplattiert. Nach einer Inkubation von 48 Stunden bei 41,5°C konnten die Kolonien gezählt werden und die Konzentration des Inokulums auf 2x10<sup>8</sup> CFU pro Milliliter, also 4x10<sup>7</sup> CFU pro Tier festgelegt werden. Fünf Tage nach Infektion wurden alle Tiere euthanasiert und Caecalgewebe entnommen. Dieses wurde in RNAlater verbracht und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert.

#### 4.2 Isolierung primärer Leukozyten

##### Material:

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2 (siehe 4.1.4)

Biocoll Separating Solution <sup>4</sup>

Trypanblau-Lösung <sup>4</sup>

Zählkammer, modifiziert nach Neubauer

Heparinlösung (500 U/ml)

5 ml Heparin-Natrium (25.000IU/5ml) <sup>5</sup>

45 ml RPMI 1640 with Glutamax <sup>6</sup>

(Lagerung bei 4°C)

#### 4.2.1 Gewinnung von Blut und Organen

Zur Blutentnahme wurden entweder die *Vena jugularis dextra* oder die *Vena cutanea ulnaris superficialis* gewählt. Handelsübliche Spritzen wurden mit 0,2 ml Heparinlösung (500U/ml) beschichtet und mit Kanülen der Größe 0,7 x 40 mm versehen.

Die Organentnahme erfolgte nach Schlagbetäubung und Blutentzug mittels sterilem Besteck. Die Organe wurden bis zur Weiterverarbeitung in 4°C kaltem sterilem PBS pH 7,2 auf Eis gelagert.

#### 4.2.2 Gewinnung peripherer mononukleärer Blutzellen

Die heparinisierten Vollblutproben wurden im Verhältnis 1:2 mit PBS pH 7,2 verdünnt und anschließend in einem 50ml Falconröhrchen vorsichtig über die *Biocoll Separating Solution* geschichtet. Die Dichtegradienten-Zentrifugation wurde bei Raumtemperatur und 650xg für 12 Minuten mittels eines langsam beschleunigenden und bremsfreien Programms durchgeführt. Anschließend wurden die in der Interphase befindlichen Leukozyten mittels einer Pipette entnommen und zweimalig mit PBS pH 7,2 bei 4°C und 225xg für 10 Minuten gewaschen.

#### 4.2.3 Gewinnung von Zellen aus Milz, Bursa und Thymus

Nach sterilem Eröffnen der Kapsel wurden die Organe mittels eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb in 4°C kaltem PBS pH 7,2 homogenisiert. Die gewonnene Zellsuspension wurde für 10 Minuten zur Sedimentation auf Eis gestellt. Der erhaltene Überstand wurde sedimentfrei abgenommen und anschließend in einem neuen Probengefäß bei 4°C und 225g für 10 Minuten abzentrifugiert. Im Anschluss daran wurde das gewonnene Zellpellet in PBS pH 7,2 resuspendiert und eine Dichtegradienten-Zentrifugation wurde, wie in 4.2.2 beschrieben, durchgeführt.

#### 4.2.4 Mikroskopische Beurteilung der Zellen

Die gewonnen Leukozyten wurden jeweils mittels Trypanblau-Lösung gefärbt. Somit war eine Lebend/Tot-Differenzierung möglich. Nach der Mischung von 10µl Einzelzellsuspension mit 10µl Trypanblau wurden die Zellen in eine Zählkammer (modifiziert nach Neubauer) überführt und die Zellzahl mikroskopisch bestimmt sowie die Viabilität beurteilt.

## 4.3 Zellkultur

### 4.3.1 Medien und Zusätze

Die Lagerung der im Folgenden aufgeführten Reagenzien erfolgte, wenn nicht anders angegeben bei 4°C.

#### Standardmedium

- 445ml RPMI 1640 with Glutamax<sup>6</sup>
- 50ml fetales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS)<sup>4</sup>
- 5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (Penicillin 100IU/ml; Streptomycin 100µg/ml)<sup>4</sup>
- Lagerung des FBS und der Penicillin/Streptomycin-Lösung als Aliquots bei -20°C.

#### Selektionsmedium bei der Erstellung stabil transfizierter Zelllinien

- 447,5ml RPMI 1640 with Glutamax<sup>6</sup>
- 50ml FBS<sup>4</sup>
- 2,5ml G418 (50mg/ml-Stammlösung)<sup>4</sup>

#### HEK-Medium, serumfrei<sup>7</sup>

#### FreeStyle® HEK293F-Medium, serumfrei<sup>6</sup>

#### Medium 1 (Hühnerzellen)

- 445ml RPMI 1640 with Glutamax<sup>6</sup>
- 25ml FBS<sup>4</sup>
- 25ml Hühnerserum<sup>6</sup>
- 5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung<sup>4</sup>

#### DT40-Medium

- 444ml RPMI 1640 with Glutamax<sup>6</sup>
- 50ml FBS<sup>4</sup>
- 5ml Hühnerserum<sup>6</sup>
- 1ml β-Mercaptoethanol (50mM)<sup>6</sup>

#### Medium 2 (Hühnerzellen)

- 445ml RPMI 1640 with Glutamax<sup>6</sup>
- 40 ml FBS<sup>4</sup>
- 10ml Hühnerserum<sup>6</sup>
- 5 ml Penicillin/Streptomycin<sup>4</sup>

#### Fusionsmedium

- 425ml Iscove Basal Medium<sup>4</sup>
- 50ml Fetal Bovine Serum, ultra-low IgG<sup>4</sup>
- 10ml HAT-Supplement (50x)<sup>6</sup>
- 5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung<sup>4</sup>
- 10ml murines IL-6 (Überstand der Zelllinie X-63)<sup>8</sup>

#### Erhaltungsmedium

- 425ml Iscove Basal Medium<sup>4</sup>
- 50ml Fetal Bovine Serum, ultra-low IgG<sup>4</sup>
- 10ml HT-Supplement (50x)<sup>6</sup>
- 5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung<sup>4</sup>

10ml murines IL-6 (Überstand der Zelllinie X-63) <sup>8</sup>

#### Hybridoma-Medium

445ml Iscove Basal Medium <sup>4</sup>

50ml Fetal Bovine Serum, ultra-low IgG <sup>4</sup>

5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung <sup>4</sup>

#### Einfriermedium

9ml FBS <sup>6</sup>

1ml DMSO (Dimethylsulfoxid, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) <sup>3</sup>

### 4.3.2 Kultivierung der Zelllinien

Adhärenent wachsende Zelllinien wurden entweder vorsichtig abgeklopft oder im Falle der Linie HD11 mit einem Zellschaber abgeschabt. Im Anschluss daran wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 geteilt und das entnommene Volumen mit jeweils frischem Medium ersetzt. Suspensionszellen wurden direkt geteilt. Die Kultivierung der humanen Linien erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, Hühnerzelllinien wurden bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

**Tabelle 2: Zelllinien**

Zelllinie	Zellart	Spezies	Medium	Referenz
HEK293	Embryonale Nierenzellen	Mensch	Standardmedium	[108]
HEK293T	Embryonale Nierenzellen	Mensch	Standardmedium	[109]
HEK293F	Embryonale Nierenzellen	Mensch	FreeStyle-Medium	[110]
HD11	Makrophagenzelllinie	Huhn	Medium 1	[111]
MSB1	MD transformierte T-Zellen	Huhn	Medium 2	[112]
HP89	MD-transformierte T-Zellen	Huhn	Medium 2	[113]
DT40	Bursale B-Zellen	Huhn	DT40 – Medium	[114]
RP9	MD transformierte B-Zellen	Huhn	Standardmedium	[113]
2D8	REV-transformierte B-Zellen	Huhn	Standardmedium	[115]
BM2	Myeloide Zellen	Huhn	Medium 1	[116]
MQ-NSCU	Makrophagenzelllinie	Huhn	Medium 1	[117]
855-23	REV-transformierte T-Zellen	Huhn	Standardmedium	[118]

### 4.3.3 Kultivierung und Stimulation primärer Zellen

#### Material:

**Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2 (siehe 4.1.4)**

**Biocoll Separating Solution <sup>4</sup>**

**Trypanblau-Lösung <sup>4</sup>**

**Zählkammer, modifiziert nach Neubauer**

**Heparinlösung (500 U/ml)**

5 ml Heparin-Natrium (25.000IU/5ml) <sup>5</sup>

45 ml RPMI 1640 with Glutamax <sup>6</sup>



**Standardmedium (siehe 4.3.1)**

**Petrischalen, tissue culture treated** (Durchmesser 10cm, Einmalplastikware) <sup>9</sup>

**TLR-Liganden sowie weitere Reagenzien zur Stimulation** (siehe Tabelle 3)

**peqGold Trifast** <sup>10</sup>

Mit einer heparinisierten Spritze wurde eine ausreichende Menge Hühnerblut von Tieren der Linie M11 genommen. Die Isolation der mononukleären Zellen wurde wie in 4.2.2 beschrieben durchgeführt. Die mikroskopische Beurteilung sowie die Zellzahlbestimmung erfolgte wie in 4.2.4 beschrieben. Die Zellzahl wurde auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in Standardmedium eingestellt. Je 10ml ( $1 \times 10^8$  Zellen) dieser Zellsuspension wurde anschließend auf die Petrischalen verteilt. Pro Stimulanz wurden drei Schalen für drei unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte präpariert. Für 15 Schalen wurden im Durchschnitt etwa 40ml Blut benötigt. Nach 24stündiger Inkubation bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden alle Schalen dreimal mit PBS pH 7,2 gewaschen um die nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Anschließend wurden sie mit frischem Standardmedium versorgt. Nach einer weiteren Inkubation von 24 Stunden bei den genannten Bedingungen wurden die Schalen erneut dreimalig mit PBS pH 7,2 gewaschen. Bei der folgenden mikroskopischen Beurteilung konnte eine Makrophagenkultur mit hohem Reinheitsgrad beobachtet werden (mikroskopische Beurteilung >95%). Nach Zugabe von frischem Standardmedium wurden je drei Schalen mit den in Tabelle 3 aufgelisteten Reagenzien stimuliert und bei oben genannten Bedingungen inkubiert. Jeweils 3, 6 und 16 Stunden später wurde das Medium abgenommen, die Schalen nochmals dreimal mit PBS pH 7,2 gewaschen und mithilfe eines Zellschabers in je 3ml Trizol abgeschabt, auf 2ml Cups verteilt und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

**Tabelle 3: Beschreibung und eingesetzte Konzentrationen der verwendeten Stimulanten**

Rezeptor	Ligand	Konzentration
TLR2/TLR6	PGN <sup>11</sup>	2µg/ml
TLR3	Poly I:C <sup>11</sup>	25µg/ml
TLR4	LPS <sup>11</sup>	10µg/ml
TLR5	Flagellin <sup>11</sup>	10µg/ml
TLR7/TLR8	R848 <sup>11</sup>	1µg/ml
TLR21	ODN2006 <sup>11</sup>	5µM
NOD	MDP <sup>11</sup>	5µg/ml
IFN-γR	chIFN-γ <sup>8</sup>	1:500 (Zellkulturüberstand)

#### 4.3.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen abzentrifugiert und auf eine Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in Einfriermedium eingestellt. Die Zellsuspension wurde anschließend in Aliquots von 1,8 ml auf Kryovials aufgeteilt. Diese wurden über Nacht in einer isopropanolhaltigen Einfrierbox bei  $-80^\circ\text{C}$  mit einer Kühlrate von  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  gelagert und baldmöglichst, spätestens aber nach drei Monaten in einen Tank mit flüssigem Stickstoff <sup>11</sup> umgelagert.

#### 4.3.5 Auftauen von Zellen

Die gefrorenen Kryovials wurden unter Schwenken im  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad aufgetaut und möglichst rasch in ein 50ml-Probengefäß überführt. Unter ständigem Schwenken des Probenröhrchens wurde tropfenweise kaltes RPMI hinzugegeben um das zytotoxische DMSO zu verdrängen. Ab einem zugegebenen Volumen von etwa 15ml wurde das Röhrchen mit kaltem RPMI aufgefüllt und bei  $225 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 10min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen zweimalig in PBS gewaschen und zur Kultivierung in dem jeweiligen Medium aufgenommen und entweder in 6-Loch-Platten oder Zellkulturflaschen angemessener Größe überführt.

### 4.4 Immunohistochemie

#### 4.4.1 Anfertigen der Gewebeschnitte

Material:

Flüssiger Stickstoff <sup>12</sup>

Cryomatrix <sup>13</sup>

Aceton 100% <sup>3</sup>

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2 (siehe 4.1.4)

Primärer unkonjugierter Antikörper (CVI 68.1) <sup>14</sup>

Sekundärer peroxidase-konjugierter Antikörper (goat-anti-mouse HRP) <sup>15</sup>

Mausserum <sup>16</sup>

Hühnerserum <sup>6</sup>

2-Komponenten-Entwicklungslösung

20µl 3,3'-diaminobenzidine (DAB) <sup>16</sup>

1ml DAB+ Substratpuffer <sup>16</sup>

ChemMate Hematoxylin <sup>17</sup>

Ethanol 100% <sup>3</sup>

Xylol <sup>3</sup>

Kanadabalsam <sup>16</sup>

Aqua dest

Objektträger und Deckgläschen

Direkt nach der sterilen Entnahme des Caecalgewebes wurde dieses in 0,5 x 0,5cm große Stücke zugeschnitten und auf Alufolie in flüssigen Stickstoff verbracht. War das Gewebe komplett durchgefroren wurde es mit der Alufolie ummantelt und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Vor der Anfertigung der Gewebeschnitte wurde das Caecalblöckchen für 30 Minuten zum Temperaturangleich im Kryostat belassen. Anschließend wurde das Gewebe mit der Kryomatrix auf den Objektisch aufgefroren. Die Gewebeschnitte wurden in einer Schichtdicke von 7µm angefertigt, auf einen Objektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur 4-48 Stunden getrocknet. Die Schnitte wurden dann für 10 Sekunden in Aceton fixiert und in Alufolie gewickelt bei -20°C gelagert.

#### 4.4.2 Färben der Gewebeschnitte

Nachdem die Gewebeschnitte etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut wurden, wurden sie für 10 Minuten mit Aceton fixiert und für 15 Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurden 200µl des verdünnten primären Antikörpers gegen Monozyten/Makrophagen (CVI 68.1) auf den Objektträger aufgebracht. Nach einer Inkubation von 30 Minuten in einer feuchten Kammer wurden die Objektträger zweimalig mit PBS pH 7,2 gespült. Es folgte die Inkubation des Gewebeschnittes für 30 Minuten mit entweder einem 1:100 in PBS pH 7,2 verdünnten Mausserum (Kontrollpräparate) oder einem goat-anti-mouse Peroxidase-konjugierten Antikörper (Verdünnung 1:100 in PBS pH 7,2, 25% Hühnerserum). Nach einem zweimaligen Waschschrift mit PBS pH7,2 wurden 100µl der frisch angesetzten Entwicklungslösung (DAB) auf die Schnitte aufgetragen, 5 Minuten inkubiert und wiederum mit PBS pH 7,2 gespült. Dieser Entwicklungsschritt wurde im Anschluss noch einmal wiederholt. Durch mikroskopische Begutachtung wurde das Entwicklungsergebnis kontrolliert. Waren die gewünschten Markierungen gut sichtbar, aber eine mögliche Hintergrundfärbung noch nicht vorhanden, wurde die Entwicklungsreaktion mit Aqua dest. abgestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte durch Auftropfen einer Hämatoxylinlösung für eine Minute. Nach einer kurzen Spülung mit Aqua dest. wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten unter fließendem Wasser gebläut, nochmalig mit Aqua dest. gespült und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Nach Eindecken der Präparate mit Kanadabalsam und Deckglas standen die

Gewebeschnitte für die Beurteilung im Hellfeldmikroskop sowie für die digitale Fotografie bereit. Die Analyse der digitalen Bilder erfolgte mithilfe von analySIS, SIS, Münster.

Positiv markierte Strukturen erscheinen im Hellfeldmikroskop braun, die Zellkerne sind immer blass blau angefärbt. In den Kontrollpräparaten erscheinen die Zellkerne ebenfalls blau, jedoch sind hier keine braun angefärbten Strukturen sichtbar. Diese Kontrollpräparate dienen der Bestimmung unspezifischer Bindung des sekundären Antikörpers im Gewebe. Ein Positiv-Kontrollpräparat wurde immer mitgefärbt und diente als Kontrolle der eingesetzten Antikörperkonzentration.

## 4.5 Herstellung monoklonaler Maus-Antikörper

### 4.5.1 Immunisierung von Balb/c-Mäusen

Zur Herstellung eines Hybridoms wurde eine Maus dreimalig im Abstand von drei Wochen immunisiert. Für die Immunisierungen wurden jeweils  $1 \times 10^8$  Zellen der entsprechenden stabil transfizierten Zelllinien (chCCRa-HEK293 und chCCRb-HEK293) in jeweils 500  $\mu$ l sterilem PBS pH7,2 suspendiert und intraperitoneal injiziert. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere zur sterilen Entnahme der Milz durch zervikale Dislokation getötet.

### 4.5.2 Zellfusion

**Material:**

**RPMI 1640 with Glutamax<sup>4</sup>**

**Polyethelene Glycol 1500 (PEG)<sup>18</sup>**

**SP2/0-Zellen<sup>19</sup>**

Anschließend an die sterile Entnahme der Mäusemilz wurde diese in kaltes RPMI überführt und zum Erhalt einer Einzelzellsuspension mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb homogenisiert. Die Zellsuspension wurde in ein 50ml-Falconröhrchen überführt, mit kaltem RPMI aufgefüllt und zur 10-minütigen Sedimentation auf Eis gestellt. Nach sedimentfreier Abnahme des Überstandes wurde dieser in ein neues 50ml-Falconröhrchen verbracht und für 10 Minuten mit 300xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde nach Resuspension in 10ml raumtemperiertem Iscove Basal Medium mit Trypanblau gefärbt. Dies diente der mikroskopischen Beurteilung der Zellzahl und Viabilität.

Die schon einige Tage vor der Fusion in Kultur gebrachten SP2/0-Zellen wurden ebenfalls in ein 50ml-Falconröhrchen überführt und bei 300xg und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Alle erhaltenen Zellpellets wurden in insgesamt 20ml Iscove Basal Medium aufgenommen und nach Trypanblaufärbung qualitativ und quantitativ beurteilt.

Für die Fusion wurden  $1,4 \times 10^8$  Mäusemilzzellen mit  $2,8 \times 10^8$  SP2/0-Zellen in einem 50ml-Falcon gemischt und für 5 Minuten bei 300xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach sorgfältiger Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet durch leichtes Klopfen vorsichtig gelockert. Danach wurde tropfenweise 1,5ml 37°C warmes PEG zugegeben. Dieser Vorgang nahm etwa eine Minute in Anspruch. Die erhaltene Mischung wurde im Anschluss eine Minute bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die anschließende Zugabe von Iscove Basal Medium erfolgte nach folgendem Schema: 1) tropfenweise 1ml in 30 Sekunden, 2) 3ml in 30 Sekunden und 3) 16ml in einer Minute. Die Zellsuspension wurde danach sofort für 5 Minuten bei 300xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach folgte eine Inkubation bei 37°C für 5 Minuten. Wiederum wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und die Zellen wurden in 420 ml Fusionsmedium aufgenommen. Je 200µl dieser Zellsuspension wurde daraufhin je Delle auf zwanzig 96-Flachlochplatten verteilt. Die Platten wurden 10 Tage lang bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und in regelmäßigen Abständen mikroskopisch kontrolliert.

#### 4.5.3 Screening

Nach 8-10 Tagen konnten je Delle 100 µl Zellkulturüberstand entnommen werden. Die Dellen der 96-Loch-Platten wurden direkt nach Entnahme mit frischem Medium aufgefüllt und wieder auf 37°C und 5% CO<sub>2</sub> verbracht. Für das 1. Screening wurden PBMCs durch Ficollpräparation wie in 4.2.2 beschrieben gewonnen und in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Delle auf 96-U-Loch-Platten verbracht und wie in 4.17 beschrieben bei 700xg und 4°C für eine Minute zentrifugiert. Im Anschluß wurden die Zellen in den unverdünnten Hybridoma-Überständen resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurde als sekundärer Antikörper ein anti-Maus IgG-FITC eingesetzt. Positiv getestete Klone wurden direkt nach der Messung in 24-Loch-Platten umgesetzt. Nach Dichtwachsen der Klone wurden jeweils weitere durchflusszytometrische Tests auf den transfizierten HEK293-Zelllinien (chCCRa-HEK293, chCCRb-HEK293 und chCCRC-HEK293) durchgeführt. Am Ende blieben einige wenige Klone übrig, die für eine Subklonierung in Frage kamen.

#### 4.5.4 Subklonierung, Isotyp-Bestimmung und Gewinnung von Hybridoma-Überständen

Zum sicheren Erhalt wirklich monoklonaler Antikörper wurden die ausgewählten positiven Klone im nächsten Schritt noch einmal subkloniert. Dazu wurde jeder Klon in fünf 96-Loch-Platten in einer Dichte von 0,4 Zellen/Delle ausgesät. Sobald diese Klone dicht gewachsen waren, schloss sich ein weiteres Screening wie oben beschrieben an. Die Isotypbestimmung erfolgte mit isotypspezifischen Sekundärantikörpern (anti-Maus IgG1-FITC, IgG2a-FITC, IgG2b-FITC, IgG3-FITC und IgM-FITC).

Nach dem letzten Screening wurden die Hybridome 14 Tage lang in Fusionsmedium kultiviert, um im Anschluss noch 14 Tage mit Erhaltungsmedium versorgt zu werden. Erst danach erfolgte eine schrittweise Umstellung auf Hybridoma-Medium. Die Zellkulturüberstände konnten dann für weitere Untersuchungen gesammelt werden. Die Langzeitlagerung erfolgte bei 4°C.

#### 4.6 Aufreinigung von Zellkulturüberständen über M2-Flag Säule

##### Material:

##### Anti-Flag® M2 Agarose<sup>9</sup>

Lagerung bei -20°C

Im Folgenden aufgeführte Puffer wurden autoklaviert, filtriert und bei 4°C gelagert.

##### PBS, pH 7,2 (siehe 4.1.4)

##### NaOH<sup>3</sup> 1M

##### Elutionspuffer: (Glycin-HCl 0,1M, pH 3,5)

7,51g Glycin<sup>3</sup>

ad 1Liter Aqua dest.

mit HCl auf pH 3,5 eingestellt

##### Neutralisationspuffer: (Tris-HCl 1M, pH 8,0)

12,11g Tris, reinst<sup>3</sup>

ad 100ml Aqua dest.

mit HCl auf pH 8,0 eingestellt

##### PBS mit 0,02% NaN<sub>3</sub>

0,2g NaN<sub>3</sub><sup>3</sup>

ad 1Liter PBS, pH 7,2

##### PBS mit 0,02% NaN<sub>3</sub> und 50% Glycerol

0,2g NaN<sub>3</sub><sup>3</sup>

50ml Glycerol, für Molekularbiologie<sup>3</sup>  
ad 100ml PBS, pH 7,2

Zur Aufreinigung von Proteinen aus Zellkulturüberständen sollten diese frei von zellulären Rückständen und steril sein sowie einen pH-Wert im neutralen Bereich aufweisen. Hierzu wurden die Überstände 10 Minuten bei 225xg bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der pH-Wert wurde mittels Indikatorpapier bestimmt und, wenn nötig, auf pH 7,0 korrigiert. Um eine wirklich reine, rückstandslose Flüssigkeit zu erhalten wurde der Überstand durch einen Filter (Porengröße 0,45µm) gereinigt.

Die Säule wurde dann zur Befeuchtung des Systems für 5 Minuten auf höchster Laufgeschwindigkeit (1ml/min) erst mit PBS pH 7,2 und im Anschluss ebenfalls 5 Minuten mit NaOH gespült. Das NaOH wurde für etwa 10 Minuten in der Säule belassen und diese dann nochmal für etwa 10 Minuten mit PBS pH 7,2 ausgespült. Direkt danach konnte die Gelmatrix blasenfrei eingefüllt werden. Nach einer Überschichtung mit 2-3ml PBS pH 7,2 wurde die Matrix 30 Minuten bei einer Laufgeschwindigkeit von 1ml/min mit PBS pH 7,2 gespült um das Glycerol des Gels vollständig zu entfernen.

Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Nun wurde der Zellkulturüberstand mit einer Geschwindigkeit von 1ml/min über die Säule gepumpt. Im Durchschnitt liefen pro Aufreinigung etwa 1000ml über die Matrix, deren Bindungskapazität bei ca. 1µg Flag-getagtem Protein liegt. Der Durchfluss wurde aufgefangen und aufbewahrt. Nach Spülen der Säule mit PBS pH 7,2 für mindestens 30 Minuten konnte der Elutionspuffer angeschlossen werden. In die vorbereiteten sterilen Auffanggefäße wurden zur Neutralisation 10µl Tris-HCl 1M (pH 8,0) vorgelegt. So wurden nach und nach etwa zwanzig 1ml Portionen Eluat aufgefangen.

Die Säule wurde im Anschluss zur Reäquilibration der Gelmatrix 30 Minuten mit PBS pH 7,2 gespült und zur Lagerung entweder in PBS mit 0,02% NaN<sub>3</sub> oder PBS in 0,02% NaN<sub>3</sub> und 50% Glycerol gebettet.

Aufgrund der Empfindlichkeit des Proteins wurden die Eluate nicht dialysiert sondern sofort für Untersuchungen verwendet bzw. in Aliquots bei -20°C gelagert.

## 4.7 SDS-Gel

### Material:

#### 4x TrisHCl/SDS Puffer pH 8,8

91g Tris<sup>3</sup>  
2g SDS<sup>3</sup>  
ad 500ml Aqua dest.,  
pH mit HCl auf 8,8 eingestellt, Lagerung bei 4°C

#### 4x TrisHCl/SDS Puffer pH 6,8

6,05g Tris<sup>3</sup>  
0,4g SDS<sup>3</sup>  
ad 100ml Aqua dest.  
pH mit HCl auf 6,8 eingestellt, Lagerung bei 4°C

#### APS 10%

0,5g Ammoniumpersulfat (APS)<sup>3</sup>  
ad 5ml Aqua bidest.  
Lagerung bei -20°C in Aliquots

#### TEMED (N,N',N',N'-Tetramethyläthylendiamin)<sup>3</sup>

#### Trenngel 15%

2,5ml Aqua bidest.  
2,5ml 4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8  
5ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung<sup>3</sup>  
50µl APS 10%  
10µl N,N',N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)<sup>3</sup>  
in der aufgeführten Reihenfolge mischen, zur sofortigen Verwendung

#### Sammelgel 4%

6,17ml Aqua bidest.  
2,5ml 4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8  
1,33ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung<sup>3</sup>  
50µl APS 10%  
20µl TEMED<sup>3</sup>  
in der aufgeführten Reihenfolge mischen, zur sofortigen Verwendung

#### 5x Elektrophoresepuffer

15,1g Tris<sup>3</sup>  
72,0g Glycin<sup>3</sup>  
5,0g SDS<sup>3</sup>  
ad 1000ml Aqua dest.  
zum Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. verdünnen; Lagerung bei 4°C

#### 6x Probenpuffer (Lämmli) nicht reduzierend

7ml 4x TrisCl/SDS-Puffer pH 6,8



3ml Glycerol<sup>3</sup>  
1g SDS<sup>3</sup>  
1mg Bromphenolblau<sup>3</sup>  
ad 10ml Aqua bidest.  
Lagerung bei -20°C

**DTT 1M<sup>13</sup>**

**Prestained Protein Molekulargewichtsmarker, 10-180kDa<sup>20</sup>**

**Aqua bidest**

Je nach Molekulargewicht des Proteins werden Trenngele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen gegossen. Chemokine sind relativ kleine Moleküle mit folglich niedrigem Molekulargewicht, deshalb sind hierfür Gele mit höheren Acrylamidkonzentrationen besser geeignet. Es wurden somit jeweils Trenngele mit 15% Acrylamid hergestellt.

Zu Beginn wurden 2,5ml Aqua bidest mit ebensoviel 4xTris-HCL/SDS Puffer pH 8,8 und 5ml Acrylamid invertiert. Direkt nach Zugabe von 50µl APS und 10µl TEMED wurde die Lösung bis etwa 1cm unter den Rand der Gelkassette eingefüllt und mit Aqua bidest überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten wurde das Aqua bidest. von den Trenngelen abgegossen. Restfeuchte konnte mit einem Filterpapier aufgenommen werden.

Folgende Komponenten des Sammelgels wurden in der angegebenen Reihenfolge in ein 15ml-Falconröhrchen pipettiert und vorsichtig 3x geschwenkt.

Aqua bidest	3,05ml
4xTris-HCL/SDS pH 6,8	1,25ml
30% Acrylamid	0,65ml
APS	25µl
TEMED	7,5µl

Diese Lösung wurde anschließend bis zum oberen Rand der Gelkassette auf das Trenngel pipettiert. Im direkten Anschluss wurde der gewünschte Kamm luftblasenfrei eingefügt und das Gel weitere 30 Minuten zur Polymerisation bei Raumtemperatur belassen. Sammelgele enthalten immer 4% Acrylamid. Die genannten Mengen ergaben immer 2 Gele.

Nach Ende der Polymerisationszeit wurde der Kamm langsam nach oben aus dem Gel herausgezogen. Das fertige SDS-Gel konnte nun in die Elektrophoresekammer, die zuvor mit 1x Elektrophoresepuffer befüllt wurde, eingespannt werden.

Die Proben wurden je nach gewünschtem Volumen mit der entsprechenden Menge Lämmli-puffer nicht reduzierend gemischt, für 5min bei 95°C und 300rpm im Thermomixer erhitzt und abschließend kurz anzentrifugiert. Nach Zugabe von 0,5µl DTT 1M je 20µl wurden die Proben und der gewünschte Marker in die Geltaschen eingebracht.

Das Gel wurde dann mit den entsprechenden Einstellungen am *Bio-Rad Power-Pac 200* so lange laufen gelassen, bis die Lauffront den unteren Rand der Glasplatte erreicht hatte.

Nachdem die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt waren wurden die Gele für die Durchführung von Western Blots genutzt.

## 4.8 Western Blot

### Material:

**SDS-PAGE (siehe 4.7)**

**Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa<sup>20</sup>**

**Towbin-Puffer, pH 8,3**

3,03g Tris<sup>3</sup>

14,4g Glycin<sup>3</sup>

ad 900ml Aqua dest.

100ml Methanol reinst<sup>3</sup>

Mittels NaOH und HCl wurde pH 8,3 eingestellt.

Lagerung bei 4°C

**Nitrozellulosemembran BA83 Porengröße 0,2µm<sup>15</sup><sup>21</sup>**

**Filterpapier<sup>22</sup>**

**Blockierlösung**

4g Magermilchpulver<sup>3</sup>

ad 100ml PBS

**PBS-T, pH 7,2**

500µl Tween<sup>3</sup>

Ad 1000ml PBS

**ECL-Lösung<sup>23</sup>**

**Antikörper**

rabbit-anti-K203Antiserum<sup>8</sup>

goat-anti-rabbit-POD<sup>9</sup>

anti-Flag-M2 POD<sup>9</sup>

Das SDS-Gel wurde nach Abtrennung des Sammelgels zur Übertragung der Proteine auf eine Trägermembran platziert. In der Einspannvorrichtung des *BioRad Criterion Blotters* wurden Gel und Membran auf beiden Seiten durch Filterpapier und Faserpad fixiert. Die

Blottingkammer wurde mit kaltem Towbin-Puffer befüllt und nach Zugabe eines Rührfisches sowie eines gefrorenen Kühlakkus wurden für 30 Minuten 100 Volt an die Kammer angelegt.

Waren alle Proteine auf die Trägermembran übergegangen, wurde diese für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert und anschließend 3x 10 Minuten mit PBS-T gewaschen. Danach wurde die Membran mit einem in PBS-T verdünnten primären Antikörper (rabbit-anti-K203 (siehe 4.9)) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff 3x 10 Minuten mit PBS-T folgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper (goat-anti-rabbit-POD). Da als Positiv-Kontrolle ein Direktkonjugat (anti-Flag-M2 POD) zur Verfügung stand, konnte hierbei ein Inkubations- und Waschschriff entfallen.

Nach dem abschließenden 6-maligen Waschen für je 10 Minuten in PBS-T wurde das Entwicklerreagenz nach Herstellerangaben angesetzt und die Membran vollständig damit benetzt. Nach einer 1-minütigen Einwirkzeit wurde die abgetropfte Membran zwischen Plastikfolie in eine Röntgenkassette verbracht. Diese diente nur dem lichtgeschützten Transport bis zum *Chemilumineszenz Imager* an dem die Proteine digital sichtbar gemacht werden konnten.

## 4.9 Herstellung und Aufreinigung eines K203-Antiserums

### Material:

#### Freund'sches inkomplettes Adjuvans (FIA)<sup>9</sup>

##### Startpuffer

424g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}^3$  in 400ml Aqua dest.

0,936g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}^3$  in 300ml Aqua dest.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  mit  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung mischen bis pH 7,0 exakt erreicht wird.

##### Elutionspuffer (0,1M Glycinpuffer pH2,5)

3,75g Glycin<sup>3</sup> in 500ml Aqua dest

Mit HCl auf pH 2,5 einstellen

##### Trislösung 1M

1,211g Tris<sup>3</sup> in 10 ml Aqua dest.

##### Guanidinhydrochlorid 6M

57,32g Guanidinhydrochlorid<sup>3</sup>

Ad 100ml Aqua dest.

(Lagerung Raumtemperatur)

##### Dialysepuffer pH7,8

1,65g  $\text{KH}_2\text{PO}_4^3$

29,03g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}^3$

45,00g  $\text{NaCl}^3$

Ad 5l Aqua dest.

**Dialyse-Schlauchmembran (MWCO 14000)** <sup>24</sup>

In Aqua dest. mindestens 30 Minuten lang eingeweicht

**Kaninchenserum**

**ProSep®-rA High Capacity**<sup>25</sup>

#### 4.9.1 Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen K203

Um ein polyklonales Antiserum gegen K203 zu gewinnen, wurde ein Kaninchen mit 0,22mg/ml K203-Flag (in 1ml) immunisiert, das mit der analogen Menge FIA emulgiert wurde. Vor der Erstimmunisierung wurde aus der Mittelohrarterie Blut zur Herstellung eines Präimmunserums gewonnen. Bei den darauffolgenden Boosterungen wurde ebenfalls FIA benutzt.

Nach insgesamt vier Immunisierungen (Erstimmunisierung + drei Boosts) wurde dem Kaninchen in regelmäßigen Abständen Blut entnommen. Das Vollblut wurde zur Gerinnung für 20 Minuten bei 37°C inkubiert und danach bei 300xg und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend konnte das Serum abpipettiert werden, wurde danach aber zur Entfernung restlicher zellulärer Bestandteile nochmals für 10 min bei Raumtemperatur und 300xg abzentrifugiert und danach in Aliquots bei -20°C gelagert.

#### 4.9.2 Aufreinigung des Kaninchenserums mittels Affinitätschromatographie

Um die im Serum enthaltenen Antikörper aufzukonzentrieren wurden 2ml des gewonnenen Kaninchenserum 1:2 mit Startpuffer verdünnt und über eine IgG bindende ProteinA-Sepharose-Säule aufgereinigt. Zuvor wurde das System mit Startpuffer für 30 Minuten gespült. Die Laufgeschwindigkeit durfte auch hier 1ml/min nicht überschreiten. Nach dem Auftrag des verdünnten Serums auf die Säule wurde diese nochmal so lange gespült, bis auf dem Monitor wieder Basiswerte der Extinktion gemessen wurden. Zur Elution des gebundenen IgG wurde die Säule anschließend mit Elutionspuffer gespült. Das Eluat wurde in einem 50ml Falconröhrchen aufgefangen und direkt mit der entsprechenden Menge Tris-Lösung 1M neutralisiert. Die Säule wurde nach der Elution zunächst erneut mit ca. 30ml Startpuffer gespült um anschließend mit 20ml Guanidinhydrochlorid regeneriert zu werden. Nach einem weiterem Durchlauf von 30ml Startpuffer konnte die Säule zuletzt mit einer 20% Ethanol-Lösung versetzt werden. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

Das Eluat wurde in einen Dialyseschlauch überführt um über Nacht unter Rühren bei 4°C in 5 Litern Dialysepuffer umgepuffert zu werden. Der Gehalt an IgG im Eluat wurde am nächsten Tag photometrisch bestimmt. Die Aufbewahrung des rabbit-anti-K203 Antiserums erfolgte in Aliquots bei -20°C.

#### 4.10 RNA-Präparation

##### Material:

**RNAlater<sup>9</sup>**

**5%ige SDS-Lösung<sup>3</sup>**

**peqGold Trifast<sup>10</sup>**

**1,4mm Zirkoniumoxide Beads<sup>10</sup>**

**Chloroform<sup>3</sup>**

**75%ige Ethanol-Lösung<sup>3</sup>**

**Nucleasefreies Wasser<sup>8</sup>**

##### 4.10.1 Gewebehomogenisierung

Nach der sterilen Entnahme der Caecumstücke wurden diese mit sterilem PBS pH 7,2 vorsichtig gespült und bis zur weiteren Verarbeitung in *RNAlater* fixiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C wenn die Proben innerhalb weniger Tage weiter verarbeitet wurden und bei -20°C für die Langzeitlagerung. Zur Homogenisierung wurden jeweils 50-100mg der Gewebeproben in 1ml Trizol überführt und mittels der vorgelegten Zirkoniumbeads (0,6g) im Precellys24 zwei Mal 30 Sekunden bei 6500 Umdrehungen zerkleinert. Im Anschluss wurden die Proben direkt auf Eis abgekühlt um RNA-Degradierung zu vermeiden.

##### 4.10.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung sowohl von Zellen als auch aus Organ-Homogenaten erfolgte mit Hilfe der Guanidin-Isothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Zellen aus der Zellkultur wurden in 1ml Trizol abgeschabt, sortierte Zellen nach Zentrifugation bei 225xg und 4°C (10min) in einer der Zellzahl entsprechenden Menge Trizol aufgenommen. Bis zu einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen wurden 200µl Trizol zugegeben, bis  $1 \times 10^6$  Zellen 300µl Trizol. Alle Arbeitsschritte wurden mit RNase-freiem sterilen Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt. Arbeitsflächen und Geräte wurden vor Arbeitsbeginn mit 5%iger SDS-Lösung behandelt.

Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde die Mischung für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und nachfolgend für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der darauf folgenden Zentrifugation bei 12000xg und 4°C für 15 Minuten wurden frische 1,5ml Eppendorf-Cups mit je 500µl Isopropanol 100% vorbereitet. Durch die Zentrifugation wurde die Suspension in drei Phasen getrennt. Die untere milchig-rosa farbene organische Phase enthält hauptsächlich Proteine, in der Mitte befindet sich die aus DNA bestehende weiße Interphase und darüber ist die wässrige Phase, die die RNA enthält. Von dieser wurden etwa 500µl abgenommen und zum vorgelegten Isopropanol gegeben. Nach vorsichtigem Mischen der Probe durch Schwenken wurde diese erst für 10 min bei Raumtemperatur und danach für 25 Minuten bei -20°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000xg und 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das erhaltene Pellet wurde anschließend mit 1ml 75%igem Ethanol für 5 Minuten bei 7500xg bei 4°C gewaschen und der Überstand wiederum sorgfältig abgenommen. Das RNA-Pellet wurde je nach Größe bis zu 30 Minuten unter dem Abzug getrocknet und im Anschluss in einer geeigneten Menge nucleasefreiem Wasser für 10 Minuten bei Raumtemperatur gelöst. Nach einer ebenfalls 10minütigen Inkubation bei 58°C wurde die Konzentration der RNA durch spektrophotometrische Messung bestimmt. Die Lagerung bis zur weiteren Untersuchung erfolgte bei -20°C.

#### 4.10.3 Qualitätskontrolle von RNA mittels des Agilent 2100 Bioanalyzer

**Material:**

**RNA 6000 Nano-Kit<sup>26</sup>**

**RNA Nano Ladder<sup>26</sup>**

Zur Qualitätskontrolle der RNA wurde der Agilent 2100 Bioanalyzer genutzt, mit dessen Hilfe die Integrität der RNA auf Basis der Kettenlängen der 18S und 28S rRNA digital untersucht werden kann. Der Zahlenwert des Verhältnisses dieser Kettenlängen zueinander wird als RIN (*RNA Integrity Number*) bezeichnet und kann Werte von 0 (stark degradierte RNA) bis 10 (vollständig intakte RNA) annehmen. Die RNA-Proben wurden nach Protokoll auf den Chip aufgetragen und mittels des Programmes *Agilent 2100 Expert* ausgewertet. Die Konzentrationen der vorliegenden RNA-Proben erlaubten alle die Verwendung des *RNA 6000 Nano Kits*. Als Ausschlusskriterium für weitere Untersuchungen wurde der RIN-Wert auf mindestens 7,0 festgelegt.

## 4.11 cDNA-Synthese

### Material:

RNA

RNase-freie DNaseI<sup>27</sup>

*GoScript™ Reverse Transcription System*<sup>27</sup>

Um eine Kontamination mit DNA auszuschließen wurde vor der cDNA-Synthese ein Verdau mit RNase-freier DNaseI durchgeführt. Mit Hilfe des *GoScript™ Reverse Transcription Systems* wurden danach 400µg der nun reinen RNA in cDNA umgeschrieben.

## 4.12 Erstellen von Primern

Die Erstellung der qRT-PCR Primer erfolgte unter Verwendung der Software *Primer Express 3.0* von Applied Biosciences. Klonierungsprimer und Primer für die konventionelle PCR wurden mit Hilfe der Freeware *PerlPrimer v1.1.20* erstellt. Mit der Synthese wurde die Firma MWG, Ebersberg beauftragt.

Tabelle 4: Auflistung aller verwendeten Primer

Amplikon Länge	Sequenz	O	Tm °C	Spezifität	Gebrauch
116	ACCTGCTGCACCACTTACATAACA	s	59	K203	qRT-PCR
116	GCGCTCCTTCTTTGTGATGAA	as	59	K203	qRT-PCR
136	CATGTCTAAGTACACACGGGCGGTA	s	59	18s	qRT-PCR
136	GGCGCTCGTCGGCATGTATTA	as	59	18s	qRT-PCR
279/282	TATTAAGCTTGCCCCAGTGGGACCCGACG	s	62	K203	Klonierung
279	TATAGTCGACGTCCCGCTTGACGCTCT	as	66	K203-Fc	Klonierung
282	TATATCTAGATCAGTCCCGCTTGACGCTC	as	62	K203	Klonierung
1086	TATCGAATTCCAACACACAATGGAGAAC	s	59	chCCRa*	Klonierung
1086	TATAGTCGACCAACGCAGCAGAACTTC	as	59	chCCRa*	Klonierung
1080	TATGGAATTCGCCCTTATGGAGAACTAT	s	59	chCCRb*	Klonierung
1080	TAATGTCGACCAAGTCCAGTAGAGATGTC	as	59	chCCRb*	Klonierung
1160	TATGGAATTC AATTGCCCCCTTATGGAAC	s	59	chCCRc*	Klonierung
1160	TATTGTCGACCGCCTTGAGCACCCCA	as	59	chCCRc*	Klonierung
1074	GTACCGCGGGCCCCGGGATCCAACACACAATGGAGAAC	s	54	chCCRa	Klonierung
1074	CCATGGTGGCGACCGGTGGATCCAACGCAGCAGAACTTC	as	54	chCCRa	Klonierung
1073	GTACCGCGGGCCCCGGGATCCAATTCGCCCTTATGGAGAAC	..s	62	chCCRb	Klonierung
1073	CCATGGTGGCGACCGGTGGATCCAGTCCAGTAGAGATGTC	as	62	chCCRb	Klonierung
	GTGC				
1142	GTACCGCGGGCCCCGGGATCCAATTCGCCCTTATGGAACAGA	s	65	chCCRc	Klonierung
	G				
1142	CCATGGTGGCGACCGGTGGATCCAAGAGCACCCCAGCGCT	as	65	chCCRc	Klonierung
	GTCAGAGC				
415	AGCTACACACAAATCATAAAGACGTTGC	s	60	chCCRa	RT-PCR
415	ACGCAGCAGAACTTCTTGCTCTC	as	60	chCCRa	RT-PCR
303	TCCATGTTGCTTCTTTCGTGCATACA	s	60	chCCRb	RT-PCR
303	GTCCAGTAGAGATGTCGTGCTCAG	as	60	chCCRb	RT-PCR
300	TACCACAATGTACCCTGGC	s	55	β-Aktin	RT-PCR
300	CTCGTCTTGTTTTATGCGC	as	55	β-Aktin	RT-PCR

O: Orientierung (s=sense, as=antisense); Restriktionsstellen sind fett markiert;

\*: Primer für fehlerhafte Konstrukte K148, 150 und 151 (siehe Tabelle 6)

Bei den Primern für die konventionelle PCR bzw. den Klonierungsprimern wurden entsprechende Restriktionsenzym-Schnittstellen eingefügt.

Bei der Erstellung der qRT-PCR Primerpaare wurde auf eine maximale Größe der Amplifikate von 150bp und eine einheitliche Annealing Temperatur von 59°C geachtet. Die Spezifität der Primerpaare wurde mittels Sequenzierung der amplifizierten DNA durch die Firma GATC, Konstanz bestätigt.

#### 4.13 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) bietet die Möglichkeit unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase und sequenzspezifischen Primern ein bestimmtes DNA-Segment millionenfach zu verfielfältigen. Die Bedingungen einer PCR sind in Tabelle 5 gelistet.

**Tabelle 5: Allgemeine PCR-Bedingungen**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2-10min	1
Denaturierung	95°C	15-30sec	30-40
Annealing	primerspezifisch	30sec	30-40
Elongation	70-75°C	bis 4min	30-40
Finale Elongation	70-75°C	5-15min	1

DNA-Segmente, die weiter für die Klonierung genutzt werden sollten, wurden durch PCR-Reaktionen mittels *Phusion Hot Start II Polymerase* gewonnen. Um den mRNA-Gehalt von K203 in Gewebeproben quantifizieren zu können wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Ein semiquantitativer Nachweis der mRNA der Chemokinrezeptoren in verschiedenen Zellpopulationen wurde mittels *HotStart Firepol Polymerase* erbracht.

##### 4.13.1 PCR mittels Phusion Hot Start II oder Hotstart Firepol Polymerase

**Reaktionsansatz:**

5,0µl	5x Buffer with MgCl <sub>2</sub> <sup>13</sup>
18,5µl	nukleasefreies H <sub>2</sub> O <sup>8</sup>
5,0µl	dNTPs <sup>13</sup>
10,0µl	Primer sense (1pmol/µl) <sup>29</sup>
10,0µl	Primer antisense (1pmol/µl) <sup>29</sup>
1,0µl	Template



0,5µl Polymerase<sup>13,28</sup>

Die *Phusion Hot Start II Polymerase* wurde immer dann verwendet, wenn eine möglichst fehlerfreie Amplifikation gewünscht war. Diese Polymerase weist eine extrem niedrige Fehlerquote beim Einbau von Nucleotiden in den neu zu amplifizierenden DNA-Strang auf. Die Annealingtemperatur wird jeweils primerspezifisch gewählt, die Elongationszeit wird durch die Länge des Amplifikats bestimmt.

#### 4.13.2 Quantitative RT-Polymerase Kettenreaktion

##### Reaktionsansatz:

1,5µl Primer sense (300nm)<sup>29</sup>  
1,5µl Primer antisense (300nM)<sup>29</sup>  
4,25µl nukleasefreies H<sub>2</sub>O<sup>8</sup>  
12,5µl *GoTaq Mastermix*<sup>27</sup>  
0,25µl *100x CXR Reference Dye*<sup>27</sup>  
5µl cDNA, 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt

Die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) wurde mit Hilfe des *Promega GoTaq qPCR Master Mix* nach Herstellerangaben durchgeführt. Die zuvor in cDNA umgeschriebene RNA wurde vor Herstellung des Reaktionsansatzes noch 1:10 mit nukleasemfreiem H<sub>2</sub>O verdünnt. Alle Reaktionen wurden als Duplikate angesetzt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des *7300 Real-Time PCR Systems* von Applied Biosciences. Bei der qRT-PCR entfällt der finale Elongationsschritt, jedoch schließt sich nach jeder Elongation ein Dissoziationsschritt an. Die normalisierte Berechnung der n-fachen Expressionen auf Basis des *housekeeping* Genes 18s rRNA erfolgte durch die Gleichung  $2^{-ddCT}$ .

#### 4.14 Agarose-Gelelektrophorese

##### Material:

##### 5x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

54g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)<sup>3</sup>  
27,5g Borsäure<sup>3</sup>  
20ml 0,5M EDTA<sup>3</sup>, pH 8,0  
Ad 1000ml Aqua dest

##### 0,5x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

1:10 Verdünnung des 5x Stocks mit Aqua dest.

##### 6x DNA Loading Dye mit Gelred

*GelRed™ Nucleid Acid Stain (10000x in water)*<sup>13</sup> wurde 1:100 in *6X DNA Loading Dye*<sup>13</sup> verdünnt

**DNA-Marker (*DNA-Ladder-Mix*<sup>13</sup> oder *GeneRuler™50bp DNA Ladder*<sup>13</sup>) mit Gelred**

100µl Marker<sup>13</sup>  
400µl nucleasefreies Wasser<sup>8</sup>  
100µl 6x loading dye mit Gelred

**Agarose<sup>9</sup>**

Verwendet wurden jeweils frisch hergestellte Gele mit 1% Agarose. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose abgewogen und in 0,5x TBE-Puffer in einer Mikrowelle erhitzt. Durch mehrmaliges Schwenken wurde die Agarose vollständig gelöst. Nach kurzer Abkühlzeit wurde die Lösung blasenfrei in eine Gießvorrichtung mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach einer 30minütigen Gelierphase wurde das Gel in eine Gelelektrophoresekammer überführt und mit Laufpuffer (0,5x TBE) überschichtet. Die Proben wurden mit *6xLoading Dye mit GelRed* (5 Teile Probe + 1 Teil *Loading Dye*) resuspendiert und in die Geltaschen überführt. Eine Geltasche mit DNA-Marker diente als Referenz. Bei einer konstanten Spannung von 100-130V für 30 Minuten konnten die negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung der Kathode wandern. Die so erhaltenen DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels des *Image Quant 300* Systems fotografiert. Für eine Aufreinigung von DNA direkt aus dem Agarosegel wurden die Banden mittels eines Skalpells exakt ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Cup überführt.

#### 4.14.1 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen oder PCR-Reaktionen

**Material:**

*Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System*<sup>27</sup>  
DNA-haltige Probe

Das *Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System* wurde zur Aufreinigung von DNA entweder aus Agarosegelen oder aus PCR-Reaktionen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

#### 4.14.2 Verdau von Vektoren und Inserts durch Restriktionsenzyme

**Material:**

DNA (PCR-Produkt oder Vektor)  
Restriktions-Endonukleasen<sup>20</sup>  
Enzym-spezifische Reaktions-Puffer<sup>20</sup>

Nachdem in der Gensequenz mit Hilfe des Programmes *Lasergene SeqMan*, Madison, USA geeignete Enzymschnittstellen identifiziert wurden, konnte sowohl das PCR-Produkt

als auch der gewünschte Vektor durch die entsprechenden Restriktionsenzyme verdaut werden. Durch einen DNA-Verdau werden Plasmide für eine spätere Klonierungsreaktion linearisiert. Sowohl Plasmid als auch PCR-Produkt können dadurch derart gestaltet werden, dass sie für eine anschließende Ligationsreaktion zur Verfügung stehen. Für einen diagnostischen Verdau wurden 300ng DNA eingesetzt, für einen präparativen Verdau 4µg. Alle Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers (Fermentas, St-Leon-Rot) angesetzt und inkubiert.

## 4.15 Klonierung

### 4.15.1 Dephosphorylierung von Vektoren mittels CIAP

**Material:**

*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)*<sup>20</sup>

*CIAP-Puffer*<sup>20</sup>

Plasmid-DNA, vorbehandelt durch Restriktions-Endonukleasen

Eine entsprechende Menge Vektor-DNA wurde mithilfe der *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* bei 37°C und 300rpm für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde das Enzym bei 85°C für 15 Minuten inaktiviert.

### 4.15.2 Ligationsreaktion

**Material:**

*T4 DNA Ligase*<sup>20</sup>

*10x T4 DNA Ligase-Puffer*<sup>20</sup>

Dephosphorylierter Vektor, mit Restriktions-Endonukleasen vorbehandelt

Insert, mit Restriktions-Endonukleasen vorbehandelt

Für die Ligationsreaktionen wurden Vektor und Insert zusammen mit der T4-Ligase entsprechend ihres Molekulargewichtes nach Herstellerangaben inkubiert.

Die Menge an einzusetzendem Insert wurde mit Hilfe der folgenden Gleichung ermittelt:

$$\text{Menge Insert für 1x} = \frac{\text{Eingesetzte Menge Vektor} \times \text{Anzahl bp Insert}}{\text{Anzahl bp Vektor}}$$

Berechnet wird immer der einfache Satz (1x), eine Multiplikation des errechneten Wertes ergibt folglich Werte für einen 3x-Ansatz, einen 5x-Ansatz und einen 8x-Ansatz. Die Menge des eingesetzten Vektors beträgt immer 100ng. Als Negativkontrolle wurde eine Ligationsreaktion ohne Insert mitgeführt.

#### 4.15.3 Klonierung mittels Gibson Assembly

##### Material:

*Gibson Assembly Kloning Kit*<sup>29</sup>

Vektor, linearisiert

Insert, mit entsprechenden Überhängen (mittels Phusion Hot Start II<sup>13</sup> PCR generiert)

Die aufgereinigten Fragmente wurden in einer Konzentration von 0.02–0.5 pmol pro µl zusammen mit dem *Gibson Assembly Master Mix* für 60 min bei 50°C inkubiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Transformation von 2µl dieser Reaktion in NEB 5-alpha kompetente *E. coli* streng nach Herstellerangaben. Alle weiteren Schritte wurden wie nach klassischer Klonierung durchgeführt.

Tabelle 6: Liste der hergestellten Konstrukte

Nummer	Insert	Vektor	Enzym-Schnittstellen	Länge Insert
K133	K203	P3XFLAG-MYC-CMV-25	HindIII/XbaI	283bp
K137	K203	PCR3 hu-Fc	HindIII/SalI	283bp
K138	K203	pcDNA3	HindIII/XbaI	283bp
K148	chCCRa	pE-GFP-N1	EcoRI/SalI	1074bp
K150	chCCRb	pE-GFP-N1	EcoRI/SalI	1073bp
K151	chCCRc	pE-GFP-N1	EcoRI/SalI	1142bp
K165	chCCRa	pE-GFP-N1	BamHI	1074bp
K168	chCCRb	pE-GFP-N1	BamHI	1073bp
K169	chCCRc	pE-GFP-N1	BamHI	1142bp

#### 4.15.4 Klassische Transformation von Bakterien (JM109)

##### Material:

##### Super optimal broth with catabolite repression Medium (SOC Medium)

5,1g	SOC Pulvermedium <sup>3</sup>
150ml	Aqua bidest.
2ml	250mM KCl <sup>3</sup> zugeben
	Mit 1M HCl <sup>3</sup> auf pH 7,0 einstellen
	Ad 200ml Aqua bidest., Autoklavieren der Lösung
1ml	MgCl <sub>2</sub> <sup>3</sup> -Lösung (2M, steril)
4ml	Glucose-Lösung <sup>3</sup> (1M, steril)

##### Lysogeny broth (LB)-Amp-Agar-Platten

Dem noch flüssigen Agar<sup>3</sup> wurde bei einer Temperatur von unter 60°C Ampicillin in einer Konzentration von 100µg/ml zugesetzt.

#### **LB-Amp-Medium<sup>1</sup>**

#### **Bakterien (chemisch kompetente *E.coli* vom Subtyp JM109)**

Die Bakterien, deren Lagerung bei -80°C erfolgte, wurden 5 Minuten lang auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurden 10µl der jeweiligen Ligationsreaktion zu den Bakterien pipettiert und durch vorsichtiges Rühren mit der Bakteriensuspension vermenget. Da die Zellwand der chemisch kompetenten Bakterien sehr instabil ist, muss ein auf- und abpipettieren unbedingt vermieden werden. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 50 Sekunden in einem 42°C warmen Wasserbad. Im Anschluss wurden die Bakterien sofort wieder auf Eis gestellt. Nach einer Zugabe von 900µl SOC-Medium wurde die Suspension für eine Stunde im 37°C warmen Thermoschüttler bei 200rpm inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 1000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das verbliebene Bakterienpellet wurde jeweils in 200µl SOC-Medium resuspendiert und auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen. Die Bebrütung der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurden die Platten entweder in den Kühlschrank verbracht oder es wurden direkt Einzelkolonien gepickt und in 4ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37°C und 200rpm hochgeschüttelt. Das Plasmid wurde danach aus der erhaltenen Bakteriensuspension wie folgt aufgereinigt.

### **4.15.5 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen**

#### **Material:**

*Wizard®Plus Miniprep Kit*<sup>27</sup>

*Pure Yield™ Plasmid Midiprep System*<sup>27</sup>

Glycerol<sup>3</sup>

850µl der Bakteriensuspension dienten in Verbindung mit 150µl Glycerol zur Herstellung von Bakterienstocks, die anschließend bei -80°C gelagert wurden. Der Rest der Suspension wurde nach Herstellerangaben zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde mittels des *Wizard®Plus Miniprep Kits* aufgereinigt und deren Konzentration im *Nanodrop2000* spektrophotometrisch bestimmt. Größere Mengen wurden unter Verwendung des *Pure Yield™ Plasmid Midiprep Systems* nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt.

### **4.15.6 Ligationskontrolle**

Mittels Agarose-Gelelektrophorese konnte der Erfolg der Ligation nochmalig kontrolliert werden. Nach einem Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen konnten die

erhaltenen Banden (Vektor und Insert) anhand ihrer Größe beurteilt werden. Anschließend wurden die Plasmide zur Sequenzierung zu GATC, Konstanz gesendet. Die erhaltenen Gensequenzen wurden weiter unter Verwendung der Software *Lasergene*® von DNASTAR, Madison, USA mit den angefertigten Karten der Konstrukte verglichen. Bei positivem Vergleich bekam die Plasmid-DNA eine Nummer und ging in die Langzeitlagerung bei -20°C.

## 4.16 Eukaryotische Expression rekombinanter Proteine

### Material:

HEK-Medium, serumfrei<sup>7</sup>

RPMI 1640 with Glutamax<sup>6</sup>

Fugene HD<sup>27</sup>

293fectin<sup>6</sup>

Plasmid-DNA

G418<sup>11</sup>

### 4.16.1 Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen bzw. HEK293F-Zellen

Die in der Wachstumsphase befindlichen HEK293T-Zellen wurden auf einer 24-Loch-Platte in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Delle ausgesät. Die Zelldichte wurde am Folgetag mikroskopisch überprüft und sollte etwa 80% Konfluenz aufweisen. Alle benötigten Lösungen wurden auf Raumtemperatur gebracht und der Transfektionsansatz wurde aus 2µg DNA in 100µl RPMI 1640 ohne Zusätze und 6µl Transfektionsreagenz hergestellt. Es folgte eine Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden je 25µl des Transfektionsansatzes pro 24-Loch-Delle zu den mit frischem Medium versorgten Zellen gegeben. Für die Herstellung von rekombinantem K203 für die Chemotaxis-Assays wurde serumfreies HEK-Medium genutzt. Nach 48 Stunden konnte bei gelöstem Protein der Zellkulturüberstand abgenommen werden und nach Zentrifugation für weitere Tests genutzt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden HEK293F-Zellen mit 293fectin® Transfektionsreagenz nach Herstellerangaben transfiziert. Zellkulturüberstand von Zellen, die mit K203 in PCR3-hu-Fc transfiziert wurden, wurde anschließend für durchflusszytometrische Färbungen benutzt. Serumfreier Überstand mit ungetagtem K203 stand für funktionelle Chemotaxis-Assays zur Verfügung. Im Falle der membrangebundenen Chemokinrezeptoren konnte der Erfolg der Transfektion durch Begutachtung der Zellen im Durchflusszytometer kontrolliert werden, da diese ein GFP-Tag aufwiesen.

#### 4.16.2 Stabile Transfektion von HEK293-Zellen

Analog zur transienten Transfektion wurden HEK293-Zellen wie in 4.16.1 beschrieben in 24-Loch-Dellen ausgesät und am nächsten Tag nach dem gleichen Protokoll transfiziert. Allerdings wurden diese Zellen bereits 24 Stunden nach der Transfektion resuspendiert, danach 100 µl der Zellsuspension entnommen und in 20 ml G418-haltiges Selektionsmedium überführt. In jede Delle einer 96-Loch-Platte wurden anschließend 200 µl dieser Suspension ausplattiert und 7-10 Tage bei 37°C kultiviert. Waren nach dieser Zeit einige Klone gewachsen, so wurde die Platte gründlich aufsuspendiert und der Zellkulturüberstand bis auf wenige µl entnommen und verworfen. Die Dellen wurden mit frischem Selektionsmedium aufgefüllt und für weitere 7-10 Tage bei 37°C kultiviert. Die Klone konnten dann ein erstes Mal mit einer geeigneten Methode getestet werden. Interessante Klone wurden daraufhin weiter in 24-Loch-Platten kultiviert. Nach weiteren Tests konnte am Ende ein einziger Klon in geeigneten Zellkulturgefäßen kultiviert werden. Die erhaltene stabile Zelllinie wurde wie in 4.3.4. beschrieben eingefroren und für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### 4.17 Durchflusszytometrische Untersuchungen

##### Material:

##### Einzelzellsuspensionen

##### Primäre und sekundäre Antikörper (siehe Tabelle)

##### Fluo-Puffer

5g Albumin, bovine Fraction V<sup>9</sup>

50mg Natrium-Azid (NaN<sub>3</sub>)<sup>3</sup>

Ad 500ml PBS pH7,2; Lagerung bei 4°C

##### 7-Actinomycin-D (7-AAD)<sup>9</sup>

1mg 7-AAD in 50 µl Methanol<sup>3</sup> gelöst, ad 5ml PBS pH7,2; Lagerung bei -20°C

Zellen aus der Zellkultur wurden bei 4°C und 225xg für 10 min abzentrifugiert, gezählt und auf eine Zahl von 0,1-1x10<sup>7</sup> pro ml eingestellt. PBMCs aus Blut oder Zellen aus Organen wurden wie in 4.2.2 und 4.3.3 erklärt vorbereitet und ebenfalls auf 0,1-1x10<sup>7</sup> pro ml eingestellt, wobei hier eher die höhere Konzentration angestrebt wurde. Im Anschluss wurden je 100 µl der Zellsuspensionen auf Dellen einer 96-Rundloch-Platte verteilt.

Die in Fluo-Puffer verdünnten Antikörper (siehe Tabelle 7/8) konnten nach Zentrifugation der Platte für 1 Minute und 700xg bei 4°C und dem schwungvollen Abkippen des Überstandes mit dem erhaltenen Zellpellet resuspendiert werden. Nach Ende der

Inkubationszeit von 20 Minuten auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von 100µl Fluo-Puffer abgestoppt. Die Platten wurden anschließend wieder bei oben genannten Bedingungen zentrifugiert und der Überstand durch Abkippen entfernt.

Am Ende jeder Färbung wurde das Zellpellet in 200µl Fluo-Puffer resuspendiert und anschließend in ein Messröhrchen überführt, in das zuvor 200µl Fluopuffer vorgelegt wurden. Die Messung erfolgte im *FACS Canto II*. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte mittels der Programme *BD FACS-DIVA Version 3.0* und *FlowJo7.6.1*.

In Tabelle 7 sind alle eingesetzten primären und in Tabelle 8 alle eingesetzten sekundären Antikörper und Direktkonjugate gelistet. Referenzen sind ausschließlich in Tabelle 7 aufgeführt.

#### 4.17.1 Färbung mit direkt Fluorochrom-markierten Antikörpern

Bei Färbungen mit Direktkonjugaten entfiel ein Arbeitsschritt. Die Zellen konnten direkt mit 40µl der verdünnten Konjugate inkubiert werden und nach einmaligem Waschen gemessen werden. Mehrfachfärbungen mit Direktkonjugaten erforderten eine Vorverdünnung aller Konjugate in ihrer Arbeitskonzentration wovon dann eine Mixtur aus gleichen Teilen angesetzt wurde. 40µl dieser Mischung wurden daraufhin wieder wie oben beschrieben mit den Zellen resuspendiert, 20 Minuten auf Eis inkubiert, gewaschen und gemessen.

**Tabelle 7: Verwendete primäre Antikörper**

Antigen	Klon	Isotyp	Konzentration /Verdünnung	Hersteller	Referenz
K203-R	K203-hu-fc		1:25	8	-
chCCRa/b	chCCRa/b 1	IgG1	pur	8	-
chB6(BU1)	AV20	IgG1	1:20	31	[119, 120]
chCD3	CT3	IgG1	pur	31	[121]
chCD4	CT4	IgG1	pur	32	[122]
chCD8	3-298	IgG2b	1:2	8	[123]
chTCRγδ	TCR1	IgG1	pur	32	[124]
chTCRαVβ1	TCR2	IgG1	1:5	31	[125]
chTCRαVβ2	TCR3	IgG1	pur	32	[126]
chMz,chMQ	KUL01	IgG1	1µg/ml	32	[127]
chTz, chMz	K1	IgG2a	pur	31	[128]

chMZ: Hühnermonozyten, chMQ: Hühnermakrophagen, chTz: Hühnerthrombozyten



#### 4.17.2 Indirekte Färbung

Bei indirekten Färbungen erfolgt stets eine Färbung mit einem unkonjugierten Primärantikörper, der entweder als Zellkulturüberstand oder in aufgereinigter Form vorlag, gefolgt von einer weiteren Inkubation mit einem sekundären Fluorochrom-markierten Antikörper. Zwischen diesen Färbungsschritten erfolgte ein Waschschrift wie oben beschrieben. Jeweilige Verdünnungen wurden in Fluo-Puffer vorgenommen und bei den primären Antikörpern wurden jeweils 50µl pro Delle für die Färbungen eingesetzt, bei den sekundären Antikörpern nur 40µl. Verdünnungen mehrerer gereinigter Antikörper für Mehrfachfärbungen konnten gemeinsam in Fluo-Puffer hergestellt werden. Für Zellkulturüberstände, die unverdünnt eingesetzt werden, konnten hierbei jeweils 40µl direkt zusammen in die Delle der 96-Loch-Platte gegeben werden. Wurden Mehrfachfärbungen gleichzeitig mit aufgereinigten primären Antikörpern und Zellkulturüberständen durchgeführt, so konnten die primären Antikörper direkt in den Zellkulturüberständen verdünnt werden. Bei Einsatz von Direktkonjugaten zusammen mit unkonjugierten Antikörpern wurde das Direktkonjugat immer erst im zweiten Färbeschritt zugesetzt.

**Tabelle 8: Verwendete sekundäre Antikörper und Direktkonjugate**

Antigen	Klon	Fluorochrom	Konzentration/ Verdünnung	Hersteller
huIgG(Fc)	anti-huIgG(Fc)	Alexa Fluor 647	1:800	15
muIgG1	anti-muIgG1	FITC	5µg/ml	31
muIgG2a	anti-muIgG2a	FITC	10µg/ml	31
muIgG2b	anti-muIgG2b	RPE	2,5µg/ml	31
chB6(BU1)	AV20	FITC	2,5µg/ml	31
chCD3	CT3	FITC	50µg/ml	31
chCD4	CT4	FITC	1µg/ml	32
chCD8a	CT8	RPE	1µg/ml	32
chTCRγδ	TCR1	FITC	2,5µg/ml	31
chTCRαVβ1	TCR2	FITC	5µg/ml	31
chTCRαVβ2	TCR3	FITC	2µg/ml	31
chMz,chMQ	KUL01	RPE	10µg/ml	31
chTz, Mz	K1	RPE	1:500	8

chMZ: Hühnermonozyten, chMQ: Hühnermakrophagen, chTz: Hühnerthrombozyten

#### 4.17.3 Lebend/Tot-Färbung mit 7-AAD

Um in der Durchflusszytometrie lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurden direkt in den Messansatz von 400µl 10µl 7-AAD-Lösung pipettiert und gut gemischt. Tote Zellen wurden durch den Farbstoff markiert und konnten so in den

Einstellungen des Programmes BD FACS-DIVA Version 3.0 aus der Messung genommen werden.

## 4.18 Zellsortierung

### 4.18.1 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

#### Material:

##### Einzelzellsuspensionen

##### Primäre und sekundäre Antikörper

##### Fluo-Puffer (steril filtriert)

5g Albumin, bovine Fraction V<sup>9</sup>

50mg Natrium-Azid (NaN<sub>3</sub>)<sup>3</sup>

Ad 500ml PBS pH7,2; Lagerung bei 4°C

##### BD-Filtersiebe<sup>33</sup>

##### Standardmedium

445ml RPMI 1640 with Glutamax<sup>6</sup>

50ml fetales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS)<sup>4</sup>

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung bietet die Möglichkeit aus einer Mixtur verschiedener Zellen bestimmte Zellpopulationen anhand ihrer fluoreszierenden Merkmale gezielt zu sortieren. PBMCs für die Zellsortierung wurden wie in 4.2.2 beschrieben gewonnen und auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  pro ml in steril filtriertem Fluo-Puffer eingestellt. 5ml dieser Zellsuspension wurden in ein 50ml-Falconröhrchen überführt und mit der entsprechenden Menge des primären Antikörpers gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C wurde die Suspension mit Fluo-Puffer auf 20ml aufgefüllt und anschließend bei 225xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet konnte in 5ml Fluo-Puffer resuspendiert werden und mit den sekundären Antikörpern versetzt werden. Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 9 gelistet.

Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei 4°C wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen und in 2ml Fluopuffer aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde durch ein spezielles Zellsieb gefiltert. Um möglichst wenige Zellen zu verlieren wurde das Sieb mit 500µl Fluo-Puffer gespült. Bis zur Sortierung wurde die Einzelzellsuspension auf Eis gelagert. Kurz vor Sortierung der Zellen im *FACSariaII* wurden die Zellen nochmals aufsuspendiert und in ein mit 1ml RPMI 1640 Medium + 10% FBS beschichtetes Messröhrchen überführt.

Tabelle 9: Für die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung eingesetzte Antikörper

Antigen	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Konzentration/ Verdünnung	Hersteller
K203-R	K203-hu-fc		-	1:25	8
chCD4	2-6	IgG1	-	Pur	31
chCD8	3-298	IgG2b	-	1:2	10
huIgG(Fc)	anti-huIgG(Fc)	poly	Alexa Fluor 647	1:800	15
muIgG1	anti-muIgG1	poly	FITC	5µg/ml	31
muIgG2b	anti-muIgG2b	poly	FITC	5µg/ml	31
chMz,chMQ	KUL01	IgG1	RPE	10µg/ml	31

chMZ: Hühnermonozyten, chMQ: Hühnermakrophagen

#### 4.18.2 Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS)

##### Material:

##### Einzelzellsuspensionen

##### Primäre und sekundäre Antikörper

*Micro Beads goat-anti-mouse Isotyp IgG*<sup>34</sup>

*MACS Separation LS Columns*<sup>34</sup>

##### Fluo-Puffer

5g Albumin, bovine Fraction V<sup>9</sup>

50mg Natrium-Azid (NaN<sub>3</sub>)<sup>3</sup>

Ad 500ml PBS pH7,2; Lagerung bei 4°C

##### Magnethalter<sup>26</sup>

##### Medium

498,75ml RPMI 1640 with Glutamax<sup>6</sup>

25ml fetales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS)<sup>4</sup>

5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung<sup>4</sup>

Bei der magnetisch aktivierten Zellsortierung ist das Herausfiltern einer bestimmten Zellpopulation durch die Markierung der Zellen mittels magnetischer Beads möglich. PBMCs wurden auch hierbei analog 4.2.2 isoliert. Pro  $1 \times 10^8$  Zellen wurden 500µl Antikörper eingesetzt. Der für die Separation der Monozyten genutzte Antikörper KUL01 sowie die für die CD4+ und CD8+ T-Zellen genutzten Antikörper chCD4 (Isotyp IgG1) und chCD8 (Isotyp IgG1) wurden entsprechend in Medium verdünnt und mit den Zellen in einem 15ml-Falconröhrchen resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 20 Minuten. Zum Auswaschen des Antikörpers wurde das Röhrchen mit Medium aufgefüllt und für 10 Minuten bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Zellpellet wurde anschließend mit 500µl goat-anti-mouse IgG

Micro-Beads gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 6°C im Kühlschrank wurden die Zellen wiederum wie oben beschrieben gewaschen und der Überstand wurde komplett entfernt.

Eine MACS Separation LS Säule wurde in den Magnethalter gespannt und mit 3ml Medium gespült. Eine Zellzahl von  $1 \times 10^8$  wurde in einer entsprechenden Menge Medium aufgenommen (500µl pro  $1 \times 10^8$  Zellen) und für eine anschließende Kontrollmessung im *FACS Canto II* wurden 25 µl dieser Suspension als Probe 1 aufbewahrt. Die restliche Zellsuspension wurde in 2ml Fraktionen über die Säule pipettiert. Die magnetisch markierten Zellen verblieben in der Säule während alle anderen Zellen im Durchlauf aufgefangen wurden. Der Durchlauf diente als Probe 2. Die Säule wurde im Anschluss mit 3x 3ml Medium gewaschen und zur Elution der sortierten Zellen aus dem Magnethalter entfernt. Die Säule wurde auf einem frischen 15ml-Falconröhrchen platziert und mit 5ml Medium aufgefüllt. Mit Hilfe des bei der Halterung befindlichen Stempels wurde das Medium daraufhin durch die Säule gedrückt und das Eluat aufgefangen. 25µl dieses Eluats dienten als Probe 3. Diese sollte ausschließlich die zu sortierenden Zellen, im jeweiligen Fall Monozyten bzw.  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  T-Zellen, enthalten. Zu jeder der drei Proben wurden 500µl Fluo-Puffer pipettiert und es folgte eine durchflusszytometrische Messung und somit eine Bestimmung der Reinheit des Eluats. Die Reinheit sollte mindestens 97% betragen.

Die separierten Zellen wurden anschließend bei 225xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Für die RNA-Isolierung wurde das erhaltene Zellpellet in 1ml Trizol aufgenommen und bis zur Isolierung bei -20°C gelagert. Für anschließende Chemotaxis-Assays oder Kultivierung wurden die Zellen in Chemotaxismedium oder Standardmedium resuspendiert und auf eine entsprechende Zellzahl eingestellt. Die weitere Verwendung der Zellen wird in 4.10.2 bzw. 4.19 beschrieben.

#### 4.19 Chemotaxis-Assays

##### Material:

**Zellen** (Zelllinie HP89 bzw. Primäre Monozyten)

**HEK-Medium, serumfrei**<sup>7</sup>

**Chemotaxis-Medium**

48,75ml RPMI 1640 with Glutamax<sup>6</sup>

1,25ml 20%iges BSA<sup>9</sup> (endotoxinfrei, gelöst in RPMI1640, Lagerung bei -20°C)

**Bovines Fibronectin**<sup>6</sup> (10µg/ml gelöst in endotoxinfreiem Aqua dest. <sup>14</sup>)

**24-well-Transwell-Platten**<sup>35</sup> (6,5mm Diameter, 5,0µm Porengröße)

**Chemokin** (Zellkulturüberstände aus serumfrei transfizierten HEK 293T)

**BD FACSTrucount Tubes**<sup>33</sup>

Zur Vermeidung unspezifischer Migration wurden alle Arbeiten mit endotoxinfreien und sterilen Einmal-Plastikwaren durchgeführt. Zudem wurde auf die Zugabe von FBS oder anderen Substanzen zum Medium verzichtet, stattdessen wurden die Zellen in einem speziellen serumfreien Medium für HEK293-Zellen kultiviert und transfiziert. Das für die Transfektion verwendete Plasmid beinhaltete nur die ungetaggte K203-Sequenz, da jegliches Tag eine unspezifische Migration auslösen könnte. Die Transfektion wurde wie in 4.16.1 beschrieben durchgeführt, immer zeitlich so geplant, dass die Zellkulturüberstände am Tag des Chemotaxis-Assays zur Verfügung standen, da bei vielen Chemokinen die biologische Aktivität schon nach 1-2 Tagen nachlässt. Da bei niedrigeren Temperaturen als 20°C das Zytoskelett von Zellen rigide wird, wurde weiterhin darauf geachtet, dass alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt wurden.

Zu Beginn wurde die Porenmembran der Transwell-Einsätze mit 50µl Fibronectin-Lösung beschichtet. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde die Flüssigkeit auf der Membran vorsichtig entfernt und es folgte eine zweistündige Trocknungsphase bei 37°C im Wärmeschränk.

Während der Trocknungszeit wurden die Zellen aus der Zellkultur zur Entfernung von Serumresten zweimalig in RPMI 1640 gewaschen. Primäre Monozyten wurden wie in 4.18.2 beschrieben magnetisch sortiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in Chemotaxismedium aufgenommen und die Suspension auf eine Zellzahl von 5x10<sup>6</sup> Zellen/ml bzw 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml für primäre Zellen eingestellt. Die serumfreien Zellkulturüberstände, die das Chemokin K203 enthielten, wurden in einer log5-Verdünnungsreihe ebenfalls in Chemotaxis-Medium verdünnt. Für die Migration von primären Zellen war es nötig, sowohl die Zellsuspension, als auch die Verdünnungsreihe des Chemokins immer 1:2 mit serumfreiem Medium zu präparieren, da primäre Zellen ohne entsprechende Zusätze nur sehr kurz überleben.

Nach Abschluss der Trocknungsphase wurden 600µl der Chemokin-Verdünnungen ins untere Kompartiment der Transwellkammer gegeben. Anschließend konnten 100µl der vorbereiteten Zellsuspensionen (5x10<sup>5</sup> Zellen bzw. 1x10<sup>6</sup> Zellen) ins obere Kompartiment gegeben werden.

Für die Auswertung des Assays war es notwendig bei jedem Experiment eine 100%-Kontrolle mitzuführen. Hierzu wurden die 100µl Zellsuspension direkt ins untere Kompartiment gegeben, in dem allerdings nur 500µl Chemotaxis-Medium vorgelegt wurden. Ebenfalls wichtig ist eine Chemokinesiskontrolle, bei der Chemotaxismedium ohne Zusatz eines Chemokins ins untere Kompartiment gegeben wird. Die Chemokinesiskontrolle dient dazu, die Grundmigration der Zellen zum Medium zu bestimmen. Alle Kontrollen und Verdünnungsstufen wurden grundsätzlich als Triplets angesetzt.

Die Transwell-Platten wurden nun bei HP89-Migrationen für 90 Minuten bzw. bei der Migration primärer Monozyten für 16 Stunden bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Inserts wurden danach vorsichtig aus der Delle gehoben und die Unterseite dreimalig mit der Flüssigkeit aus dem unteren Kompartiment gespült um eventuell anhaftende Zellen noch mit zu erfassen. Im Anschluss wurden die Dellen jeweils gut aufsuspendiert und 500µl zur Quantifizierung entnommen und direkt in *FACSTrucount Tubes* überführt. Die durchflusszytometrische Zählung der migrierten Zellen erfolgte im *FACS Canto II*.

Zur Auswertung wurde das Programm *FlowJo Version 7.6.1* von Tree Star, Ashland, USA genutzt. Zur graphischen Darstellung der HP89-Migration wurde der Prozentsatz der migrierten Zellen berechnet auf Basis der 100%-Kontrolle gewählt. Bei der Migration der Monozyten stellte sich die Darstellung des Chemokinesis-Index (Anzahl migrierter Zellen der jeweiligen Probe geteilt durch die Anzahl migrierter Zellen in der Chemokinesiskontrolle) als geeigneter heraus.

#### 4.20 Statistik

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden jeweils aus mindestens drei unabhängigen Experimenten berechnet. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's T-Test ermittelt. Alle statistischen Auswertungen erfolgten mittels *Microsoft® Excel 2010* für Windows. Die Grafiken wurden entweder mittels *GraphPad Prism®* von GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA oder mittels *Microsoft® Power Point 2010* angefertigt.

## 5 ERGEBNISSE

Literaturstudien haben gezeigt, dass das Chemokin K203 in verschiedenen Infektionsmodellen mit bakteriellen, viralen und parasitären Pathogenen auffallend stark induziert war. Eine nähere Charakterisierung von K203 hat bisher allerdings noch nicht stattgefunden.

Da K203 zum ersten Mal in einer LPS-stimulierten Hühner-Makrophagenlinie (HD11) entdeckt wurde, war initial ein erstes Ziel der Arbeit, zu prüfen, ob weitere TLR-Liganden ebenfalls eine verstärkte K203-Expression in Makrophagen bewirken können. Zudem war im Hinblick auf eine Salmonelleninfektion des Huhnes von besonderem Interesse, die Kinetik der K203-Expression im Caecalgewebe zu analysieren. Zur weiteren Charakterisierung war die Identifizierung von K203-bindenden Zellen, des oder der Rezeptoren sowie die Untersuchung funktioneller Eigenschaften notwendig.

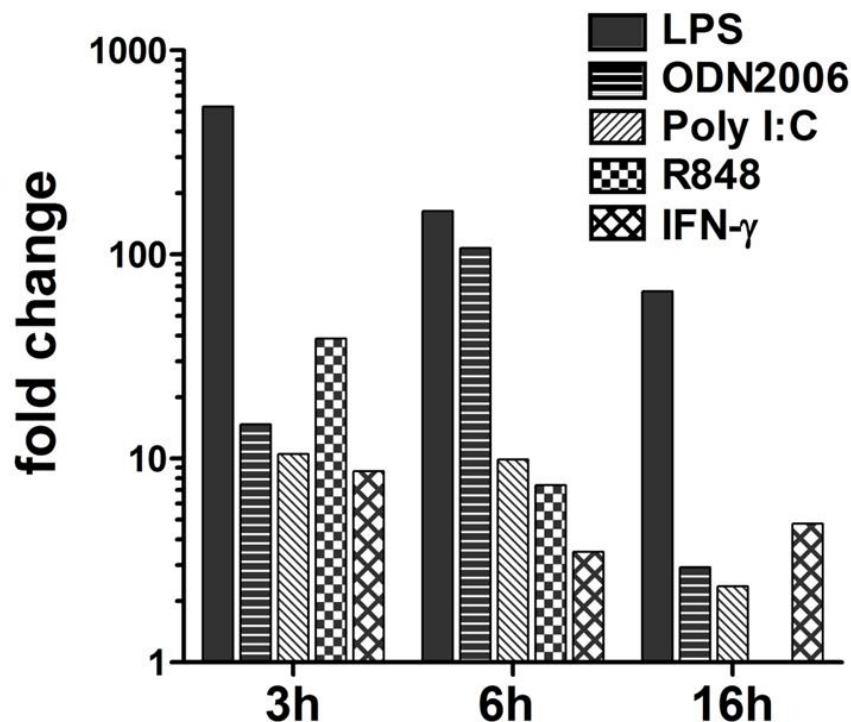
### 5.1 Expression von K203 in stimulierten primären Makrophagen

Um die erste Fragestellung zu klären wurden primäre Makrophagen aus Hühnerblut kultiviert und mit diversen TLR-Liganden sowie  $\text{IFN}\gamma$  und Muramyldipeptid (MDP) stimuliert (siehe Tabelle 3). Anschließend wurden diese in Trizol lysiert und nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese mittels qRT-PCR auf K203 mRNA Expression untersucht. Die Stimulation mit LPS, dem Ligand von TLR-4 führte wie erwartet zu einer deutlichen Induktion von K203. Zum erstem Messzeitpunkt drei Stunden p.s. konnte eine 530fache Expression berechnet auf Basis der Kontrollen gemessen werden. Bis zum letzten Testzeitpunkt 16 Stunden p.s. ging das Expressionsniveau von K203 nach LPS-Stimulation zwar wieder auf einen Wert von 66 zurück, blieb jedoch deutlich hochreguliert (Abbildung 6).

Ähnliche Beobachtungen konnten für den TLR7/8-Liganden R848 gemacht werden. Mit einem Expressionswert von ~39 nach 3 Stunden fiel die Induktion von K203 hier jedoch deutlich schwächer aus. Die Expressionskinetik von K203 nach Stimulation sowohl mit R848 als auch mit Poly I:C, dem Liganden von TLR-3, sowie  $\text{IFN}\gamma$  sah durchwegs ähnlich aus. Es erfolgte stets eine schnelle Induktion des Chemokins mit anschließendem Abfall der Expressionswerte bis zum letzten Messzeitpunkt. Jedoch lagen bei  $\text{IFN}\gamma$  und Poly I:C die höchsten Expressionsniveaus nur bei ~9 bzw. ~11 zum Zeitpunkt drei Stunden p.s. und fielen im weiteren Verlauf wieder auf das Niveau der Kontrolle zurück. Etwas anders sah es bei ODN 2006 aus. Der Ligand von TLR-21, dem Äquivalent zum TLR-9 des Säugers,

induzierte eine Expressionskinetik, bei der das Maximum der K203-Expression (~107) erst an Zeitpunkt 6h p.s. gemessen werden konnte, während bei den anderen Stimulantien dieser Peak schon nach drei Stunden beobachtet werden konnte. Nach 16 Stunden war aber auch hier die Expression von K203 wieder stark abgefallen (Abbildung 6).

Die Stimulation mit Flagellin (TLR-5 Ligand), PGN (TLR 1/2 Ligand) und MDP führte zu keinem signifikanten Anstieg der K203 mRNA Expression.



**Abbildung 6:** *In vitro* Expressionsniveau (vs. Kontrolle) von K203 in Hühnermakrophagen nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden und IFN $\gamma$ .

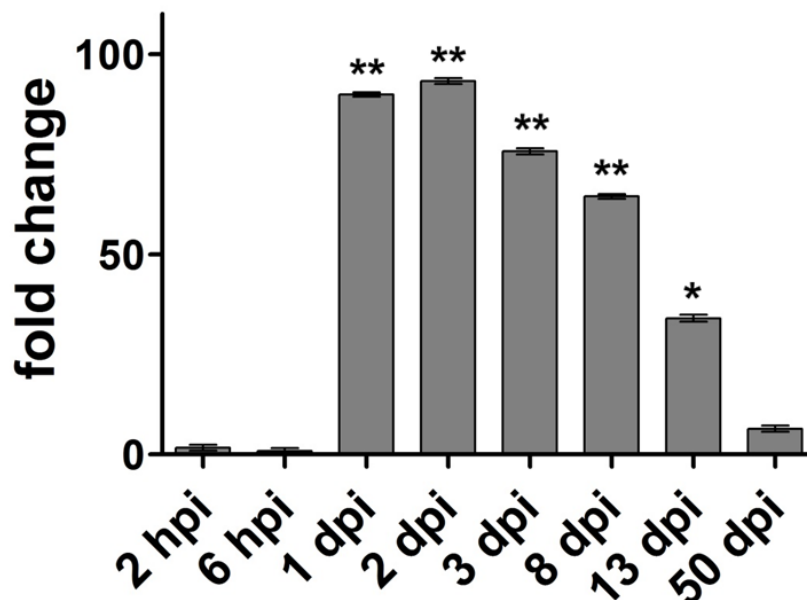
Dargestellt sind nur die Stimulanten, die eine signifikante Änderung des Expressionsniveaus hervorriefen. Der TLR-21 Liganden ODN2006 zeigte im Vergleich ein anderes Expressionsprofil und erreichte erst zum Zeitpunkt 6h p.s. maximale Expressionswerte. Alle anderen getesteten Reagenzien verursachten bereits nach 3h die stärkste Expressionsänderung von K203. Zu den späteren Messzeitpunkten konnte ein Abfall der K203-Expression beobachtet werden.

## 5.2 Expression von K203 in *Salmonella* Enteritidis infiziertem Caecalgewebe

Da in bisherigen Untersuchungen nie ein Augenmerk auf die Expressionskinetik von K203 gelegt wurde, wurde im Zuge dieser Arbeit ein Infektionsversuch durchgeführt. Hierfür wurden 24 Eintagsküken mit dem hochinvasiven *Salmonella* Enteritidis Stamm 147 ( $1 \times 10^4$  CFU/Tier) oral infiziert. Eine Kontrollgruppe derselben Größe blieb unbehandelt. Je drei Tiere wurden zu definierten Zeitpunkten (2h, 6h, 1, 2, 3, 8, 13 und 50d) geschlachtet und das Caecalgewebe wurde steril entnommen. Aus den Homogenisaten des Gewebes wurde



RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR wurden Daten zur K203-Expression gewonnen. An den ersten beiden Testzeitpunkten zwei und sechs Stunden p.i. konnte noch kein signifikanter Unterschied in der K203 mRNA-Expression zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren beobachtet werden. Jedoch war die Expression von K203 24 Stunden p.i. bei den infizierten Tieren ~90fach höher als bei den Kontrolltieren. Das Maximum der K203-Expression konnte an Tag 2 p.i. gemessen werden mit einer ~93fachen Hochregulierung gegenüber der Kontrolle. Ab Tag 3 p.i. sank das Expressionsniveau des Chemokins dann stetig, blieb aber bis Tag 13 signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrolle. An Tag 50 p.i. war die K203-Expression immer noch hochreguliert, wurde aber nicht mehr signifikant gegenüber den Kontrollwerten (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** *In vivo* Expressionsniveau von K203 in Caecalgewebe von Salmonellen-infizierten Hühnern (n=3) (berechnet auf Basis der nicht-infizierten Kontrolltiere (n=3))

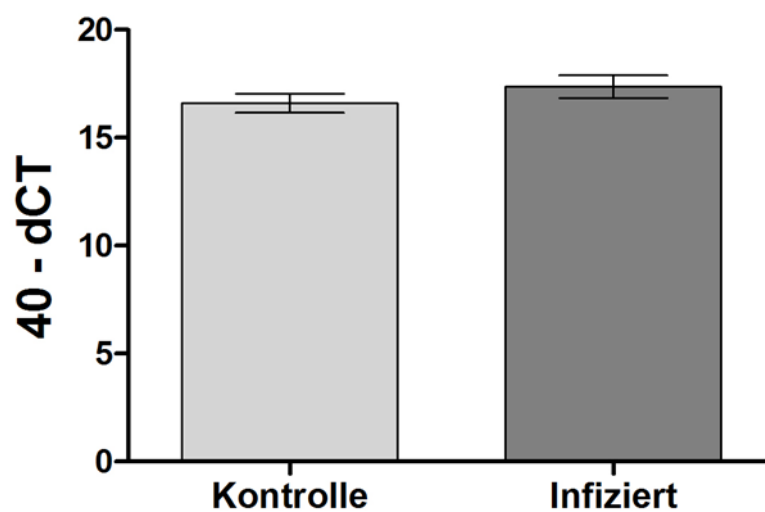
Das Chemokin K203 war bereits nach 24h sehr stark hochreguliert. Nach dem Expressionsmaximum an Tag 2 p.i. fielen die Expressionswerte dann bis zu Tag 50 p.i. langsam wieder ab.

### 5.3 Expression von K203 in *Campylobacter jejuni* infiziertem Caecalgewebe

Aufgrund der hohen Invasivität von SE 147 stellte sich die Frage, ob kaum bis gar nicht invasive Bakterienstämme eine ähnliche Induktion von K203 im Darmgewebe verursachen können. Hierfür wurde eine Gruppe von zehn Broilern an Lebenstag 22 oral mit  $4 \times 10^7$  CFU/Tier *Campylobacter jejuni* Stamm M1 in *Müller-Hinton-Broth* oral infiziert. Eine Kontrollgruppe der gleichen Zahl erhielt nur sterile *Müller-Hinton-Broth*. Fünf Tage p.i.

wurden alle Tiere getötet und Caecalgewebe entnommen. Dieser Zeitpunkt gilt als optimal für die Besiedlung des Darmes mit den Bakterien, da diese bei Broilern dieses Alters nach etwa 3 Tagen im Caecum nachweisbar sind und auch schon über den Kot ausgeschieden werden [129]. Fünf Tage p.i. sollte somit eine erste Immunreaktion stattgefunden haben.

Nach Isolierung der RNA aus den Gewebeproben und deren Umschreiben in cDNA konnte mithilfe der qRT-PCR die Expression von K203 gegenüber der Kontrolle quantifiziert werden. Jedoch zeigte die Auswertung für die Expression von K203 auf Basis der Kontrolle einen Wert von 1,70, was einer nahezu gleichen Expression von K203 in beiden Gruppen entspricht. Zur vergleichenden Darstellung wurde der 40-dCT-Wert gewählt.



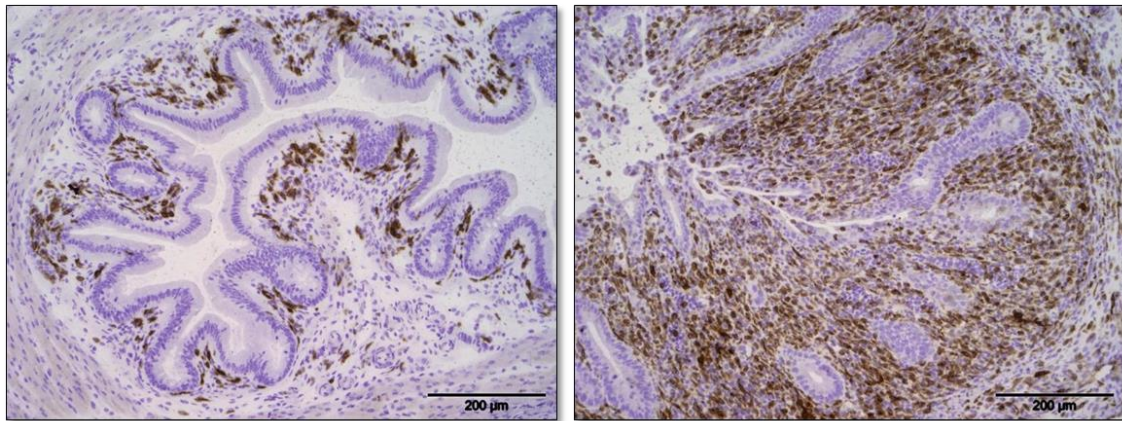
**Abbildung 8:** Vergleichende Darstellung der 40-dCT-Werte von K203 fünf Tage nach Infektion von 22 Tage alten Broilern mit *Campylobacter jejuni* Stamm M1

Sowohl die nicht-infizierte Kontrollgruppe als auch die mit *Campylobacter* infizierten Tiere zeigten nur basale Expressionswerte des Chemokins K203.

#### 5.4 Infiltration von Makrophagen ins Caecalgewebe von Hühnern nach Salmonelleninfektion

Parallel zu den Gewebeproben für die qPCR wurden weitere Caecalgewebestücke in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die histologische Untersuchung aufbewahrt. Die im Folgenden angefertigten Kryoschnitte wurden anschließend mit dem monoklonalen Antikörper CVI 68.1 gefärbt. Dieser färbt spezifisch Monozyten bzw. Makrophagen an. Die Kontrolltiere zeigten wie erwartet eine moderate Zahl von Makrophagen in der Lamina propria. Bei den *Salmonella*-infizierten Tieren jedoch konnte eine massive Infiltration von Makrophagen in die Lamina propria beobachtet werden, die 24 Stunden p.i. ihren Anfang nahm und bis Tag 50 p.i. im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht blieb

(Abbildung 9, Tabelle 10). Der Makrophagen-Score ist ein halbquantitatives Bewertungsverfahren bei dem je Präparat mindestens drei repräsentative Felder ausgewählt und dreimal ausgezählt werden. Diese *regions of interest* (ROI) werden dann anhand des computergestützten Bildanalyseprogrammes *analySIS* (SIS, Münster) anhand des angefärbten Prozentsatzes an Zellen in unten beschriebene Scores (siehe Tabelle 10) eingeordnet.



**Abbildung 9: Histologischer Vergleich der Anzahl von Makrophagen in der Lamina propria des Caecums nicht infizierter Tiere (links) gegenüber mit SE147 infizierten Tiere (rechts) zum Zeitpunkt 24h p.i.**

Bei der nicht infizierten Kontrollgruppe war eine normale Anzahl von Makrophagen in der Lamina propria nachweisbar. In der Salmonellen-infizierten Gruppe konnte eine deutliche Infiltration von Makrophagen beobachtet werden.

Werden nun die Daten der K203-Expression mit den histologischen Untersuchungen der Makrophagen-Infiltration nebeneinander betrachtet, so ergeben sich interessante Gemeinsamkeiten. 24 Stunden p.i. steigt die K203-Expression rapide an und gleichzeitig beginnt eine massive Invasion von Makrophagen in das infizierte Darmgewebe. Bis zum letzten Messzeitpunkt blieb die Zahl der Makrophagen nahezu analog zur Expression des Chemokins signifikant erhöht.

**Tabelle 10: Scores der CVI 68.1 positiven Makrophagen von nicht-infizierten und SE147-infizierten Eintagsküken im Caecum**

Lebenstag	1 2 hpi	1 6 hpi	2 1 dpi	3 2 dpi	4 3 dpi	9 8 dpi	14 13 dpi	51 50 dpi
Nicht-infiziert	1.00±0.41	0.83±0.24	1.00±0.41	1.00±0.47	1.67±0.62	2.00±0.00	1.50±0.50	2.50±0.25
SE-147-infiziert	1.00±0.00	1.00±0.00	2.33±0.24 **	3.00±0.41 *	3.83±0.24 **	3.83±0.24 **	3.75±0.25 *	3.83±0.24 **

0: keine Makrophagen; 1: sehr niedrige Zahl an Makrophagen; 2: niedrige Zahl an Makrophagen; 3: hohe Zahl an Makrophagen ; 4: sehr hohe Zahl an Makrophagen

\*: signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren (Student's t-test; \*p≤0.05; \*\* p≤0.01)

### 5.5 Klonierung von K203, K203-Flag und K203-hu-Fc

Für die weiteren Zielsetzungen war es nötig K203 in verschiedene Vektoren zu klonieren um das Protein eukaryotisch exprimieren zu können. Hierfür wurde aus der cDNA der LPS-stimulierten Makrophagen mittels PCR die Sequenz von K203 amplifiziert und in die gewünschten Vektoren kloniert. Mit den erhaltenen Konstrukten konnten dann humane embryonale Nierenfibroblasen (HEK293T) transfiziert werden. In der Zelle kommt es dann zur Produktion und Sekretion des Chemokins in das Kultivierungsmedium. Der Vektor pCDNA-hu-Fc wurde gewählt, um ein Fusionsprotein (K203 + hu-Fc-Tag) für die Durchflusszytometrie zu erhalten. Eine Bindung dieses Fusionsproteins an rezeptortragende Zellen konnte dann über einen anti-hu-Fc-Alexa 647 Antikörper sehr einfach nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde das Fusionsprotein in HEK293F exprimiert, da laborintern neue Expressionssysteme eingeführt wurden.

Mit dem Flag-getaggten Protein wurde eine stabil transfizierte Zelllinie generiert. Zu diesem Zweck wurden humane Nierenfibroblasten (HEK293) mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert. Für Bindungsversuche stellten sich diese Zellen allerdings als ungeeignet heraus, da sich das Flag-Tag am N-terminalen Ende von K203 befindet. Dort liegt auch die Bindungsstelle des Chemokins für seine Rezeptoren. Aus den Zellkulturüberständen konnte jedoch das Protein über eine M2-Flag-Säule aufgereinigt werden. Dieses wurde im Folgenden dazu genutzt ein Kaninchen zu immunisieren um ein polyklonales Antiserum zu gewinnen.

Die Expression des Chemokins ohne Tag ist für Bioassays unabdingbar, da jegliches Tag unspezifische Reaktionen auslösen könnte und somit erhaltenen Ergebnisse auch auf das Tag zurückzuführen sein könnten. Der Vektor pCDNA3 wurde für diese Klonierung ausgewählt. Das ungetaggte Chemokin konnte somit in den später beschriebenen Chemotaxisassays eingesetzt werden.

### 5.6 Durchflusszytometrische Untersuchungen

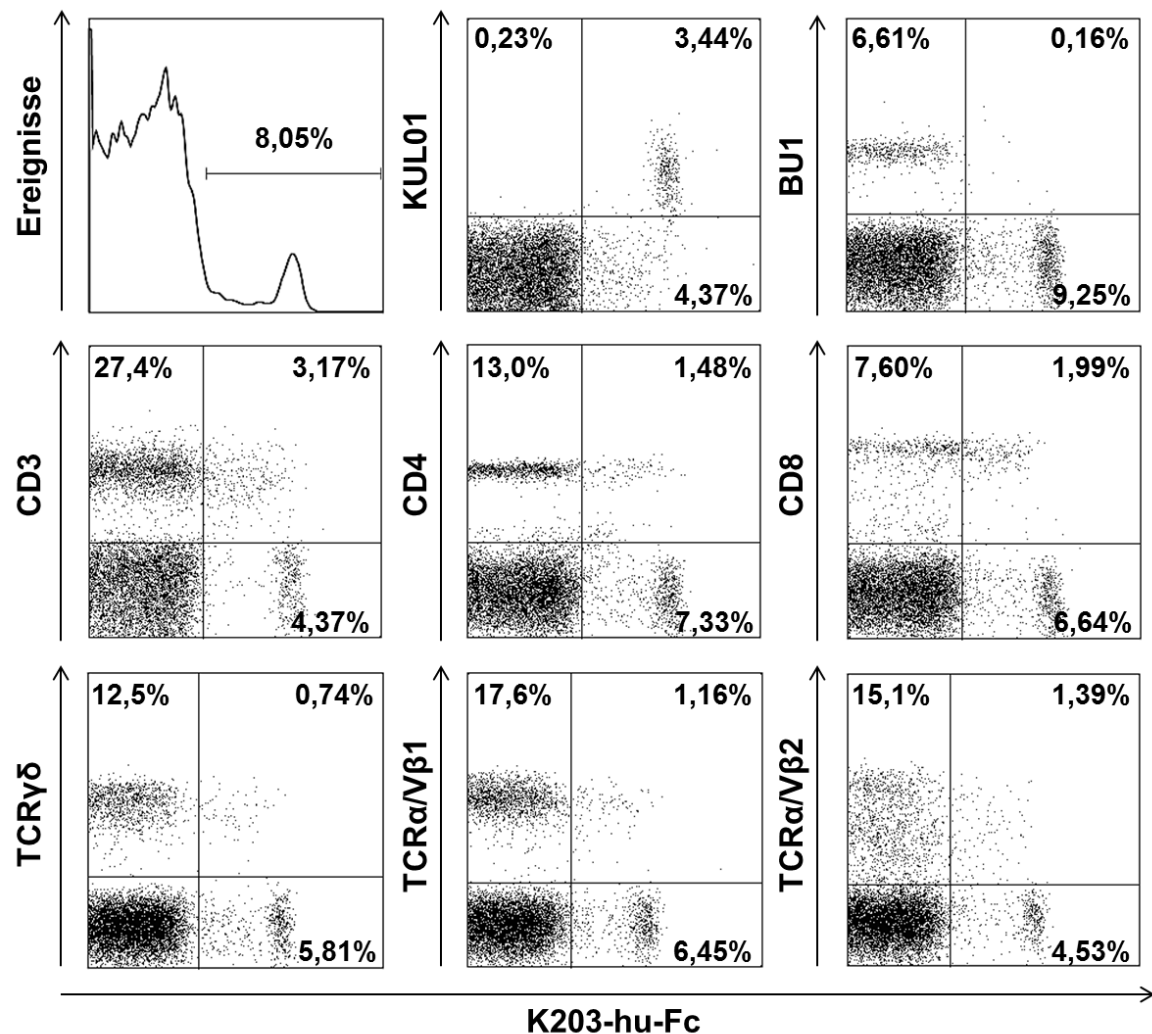
Nach Titration des Zellkulturüberstandes, der aus der transienten Transfektion des K203-hu-Fc-Plasmids in HEK 293T hervorgegangen war, stellte sich eine Verdünnung von 1:25 als ideal für die durchflusszytometrischen Messungen heraus. Detektiert wurden K203-R<sup>+</sup> Zellen mit einem goat-anti-hu-Fc Alexa 647 Konjugat. Für die Identifizierung verschiedener K203-hu-Fc-bindender Zellpopulationen wurde diese Färbung mit den jeweiligen zellspezifischen monoklonalen Antikörpern kombiniert.

### 5.6.1 K203-Bindungsstudien mit PBMCs aus Blut, Milz und Bursa

Für die Identifizierung von Zellpopulationen, die K203 binden können, wurde zunächst eine durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnene Einzelzellsuspension von PBMCs aus Blut mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Einzelfärbung mit K203-hu-Fc zeigte in allen Messungen eine Frequenz an K203-R<sup>+</sup> Zellen von 6-12%. In der dargestellten Messung zeigten 8,05% aller PBMCs im Blut eine Bindung von K203-hu-Fc (Abbildung 10).

B-Zellen sowie Thrombozyten waren in allen Messungen K203-R negativ, jedoch konnte für eine Subpopulation von T-Zellen eine Bindung von K203-hu-Fc nachgewiesen werden. In der dargestellten Messung betrug der Anteil der K203-R<sup>+</sup> T-Zellen 3,17% gemessen an der Gesamtpopulation aller PBMCs. Dieser Prozentsatz entspricht auch etwa dem Durchschnitt an K203-R<sup>+</sup> T-Zellen in allen durchgeführten Messungen. Die T-Zellen wurden weiter differenziert in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Hierbei stellte sich heraus, dass sowohl eine Subpopulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (1,48%) als auch eine Subpopulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (1,99%) eine Bindung von K203-hu-Fc zeigte. Weiterhin war bei den T-Zellen von Interesse, ob die K203-R<sup>+</sup> Population den  $\alpha/\beta$  T-Zellen oder den  $\gamma/\delta$  T-Zellen zugehörig ist. Jedoch zeigte sich auch hier kein eindeutiges Bild. 1,16% der Zellen waren sowohl  $\alpha V\beta 1$  positiv als auch K203-R<sup>+</sup>, bei den  $\alpha V\beta 2$  positiven T-Zellen waren es 1,39% und für die  $\gamma/\delta$  T-Zellen konnte nur eine Frequenz von 0,74% gemessen werden (Abbildung 10).

Alle mit KUL01 angesprochenen Monozyten zeigten hingegen eine Bindung von K203-hu-Fc. In den dargestellten Daten betrug die Zahl der Monozyten an der Gesamtpopulation der PBMCs 3,44% (Abbildung 10). Durchschnittlich werden beim Huhn Frequenzen an Monozyten von etwa 2-5% gemessen.



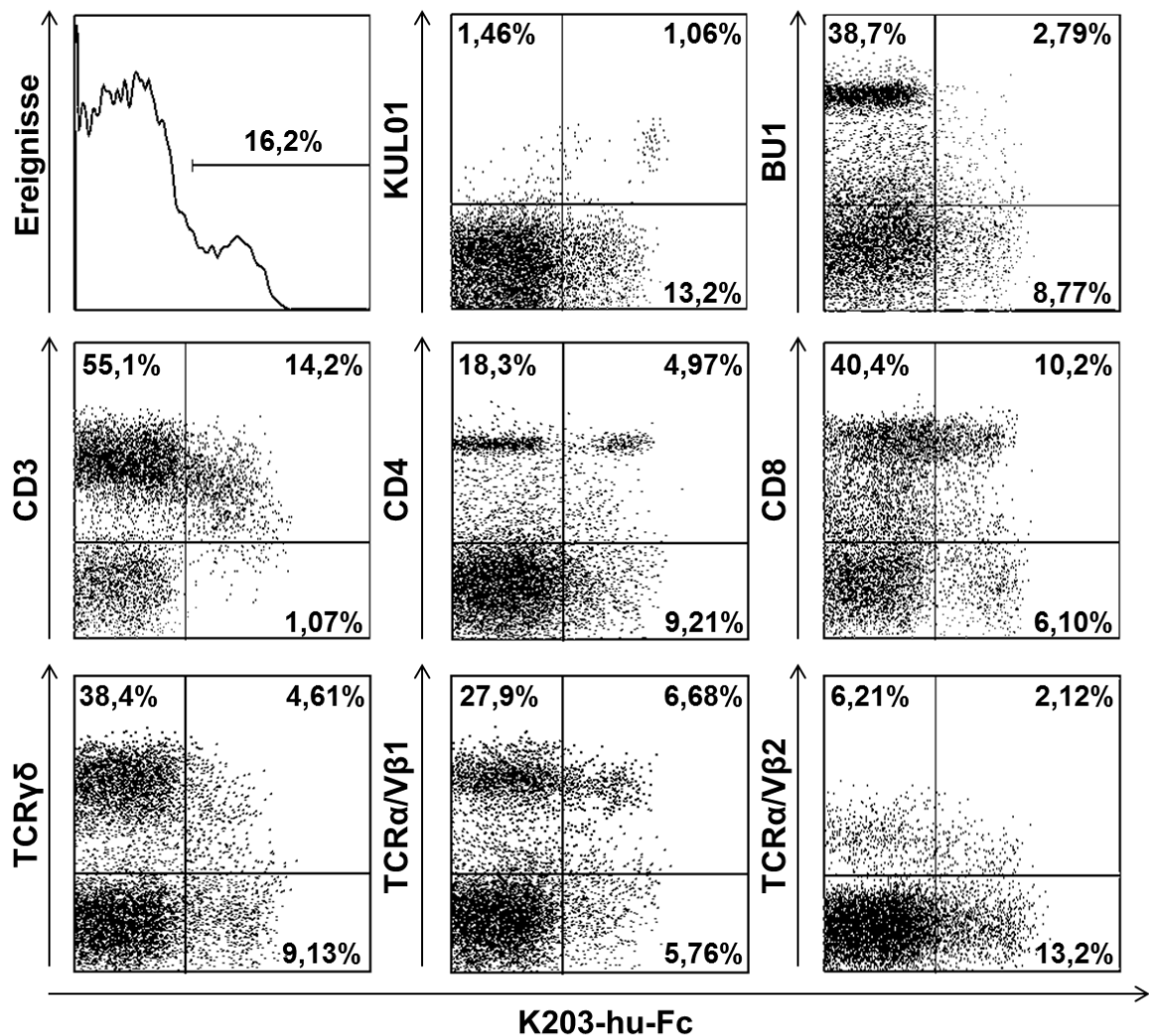
**Abbildung 10: Durchflusszytometrische Studie zur Bindung von K203-hu-Fc an die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen im Blut**

Für B-Zellen ( $Bu1^+$ ) konnte keine Bindung nachgewiesen werden, wohingegen die Gesamtpopulation von Monozyten ( $KUL01^+$ ) als  $K203-R^+$  eingestuft werden kann. Bei den T-Zellen ( $CD3^+$ ) konnte eine Subpopulation von etwa 3%  $K203-R^+$  Zellen identifiziert werden. Diese wurde mit den entsprechenden Markern noch weiter differenziert. Hierbei stellte sich heraus, dass keine distinkte Population an T-Zellen  $K203-hu-Fc$  bindet, sondern jeweilige Subpopulationen sowohl von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Zellen, als auch von  $\alpha/\beta$  T-Zellen und  $\gamma/\delta$  T-Zellen eine  $K203-hu-Fc$  Bindung zeigten.

In der Milz zeigte sich ein ganz ähnliches Bild (Abbildung 11). Insgesamt war hier die Zahl der  $K203-hu-Fc$  bindenden Zellen mit 16,2% deutlich höher. Dies liegt aber mitunter daran, dass in der Milz kaum Thrombozyten enthalten sind, wohingegen diese im Blut den Hauptbestandteil der PBMCs bilden. So könnte insgesamt betrachtet der Anteil an  $K203-R^+$  Zellen im Blut sogar höher sein als in der Milz.

Auch in der Milz waren in allen Messungen die B-Zellen  $K203-R$  negativ. Für die verschiedenen Subpopulationen an T-Zellen zeigte sich folgende Verteilung: 4,97%  $CD4^+$ , 10,2%  $CD8^+$ , 4,01%  $TCR\gamma/\delta^+$ , 6,68%  $TCR\alpha V\beta 1^+$  und 2,12%  $TCR\alpha V\beta 2^+$  T-Zellen.

Anhand der prozentual höheren Anzahl von T-Zellen an der Gesamtpopulation der PBMCs in der Milz tritt hier die unterschiedliche Verteilung der K203-hu-Fc bindenden T-Zellen viel deutlicher hervor. Da in der Milz kaum Makrophagen nachweisbar sind, konnten die KUL01<sup>+</sup> Zellen schlecht bewertet werden. Jedoch zeigte sich bei dem geringen messbaren Prozentsatz ebenfalls eine Bindung von K203-hu-Fc.



**Abbildung 11: Durchflusszytometrische Studie zur Bindung von K203-hu-Fc an die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen der Milz**

Auch in der Milz zeigte sich ein durchaus mit dem Blut vergleichbares Bild der K203-hu-Fc Bindung an die Leukozytenpopulationen. Insgesamt scheint in der Milz der Prozentsatz an T-Zellen sehr viel höher als im Blut, was jedoch damit begründet ist, dass in der Milz so gut wie keine Thrombozyten und auch sehr viel weniger Erythrozyten und Makrophagen vorhanden sind.

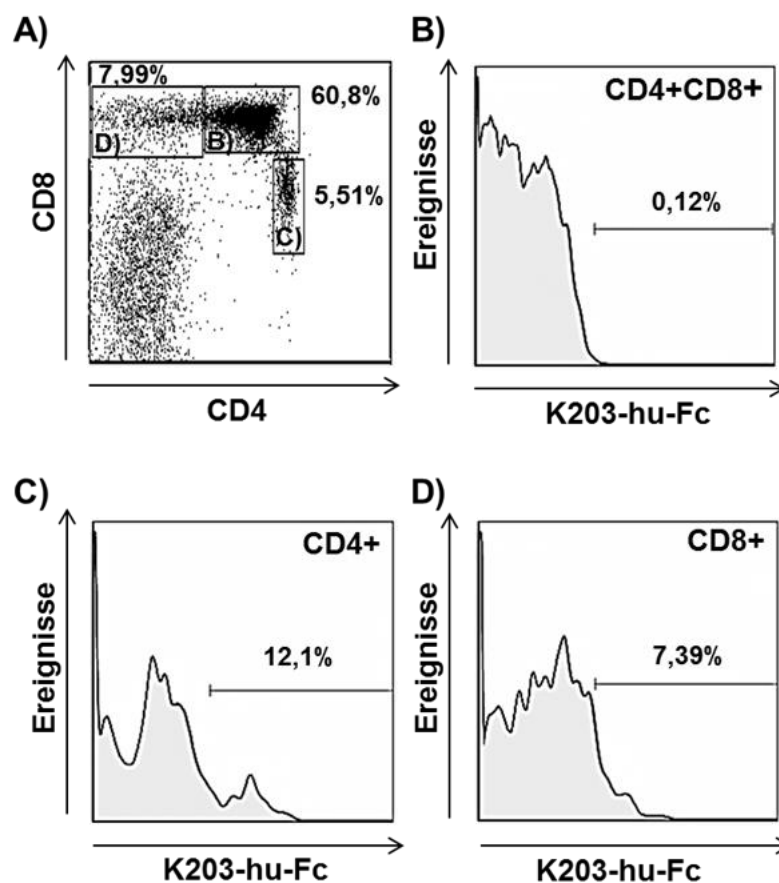
Da in der Bursa fast ausschließlich B-Zellen zu finden sind, sich diese dort aber in verschiedenen Reifungsstadien befinden, war es auch vor dem Hintergrund, dass die B-Zellen bisher keine Bindung zeigten, interessant, diese auf K203-Bindung zu untersuchen. Jedoch waren auch in der Bursa alle B-Zellen K203-R negativ. Vereinzelt positive Zellen

konnten als T-Zellen identifiziert werden. Diese wurden aber aufgrund der geringen Frequenz nicht weiter differenziert (ohne Abbildung).

In allen Färbungen waren die Zellen, die keinen zellspezifischen Marker binden konnten (hauptsächlich Erythrozyten) auch immer K203-R negativ

### 5.6.2 K203-Bindung an Thymozyten

Aufgrund der Bindung von K203-hu-Fc an diverse Subpopulationen von T-Zellen stellte sich die Frage, ob während der Reifung der T-Zellen im Thymus schon Rezeptoren für K203 auf deren Oberfläche exprimiert werden bzw. funktionell sind. Durch eine Dreifachfärbung mit anti-CD4 und anti-CD8 Antikörpern in Verbindung mit dem K203-hu-Fc Fusionsprotein konnten auch die CD4/CD8 doppelt positiven T-Zellen beurteilt werden. Diese stellen ein noch nicht differenziertes Vorläuferstadium der CD4 und CD8 einzeln positiven ausgereiften T-Zellen dar (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Expression des K203-Rezeptors auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD4/CD8 doppelt positiven T-Zellen im Thymus**

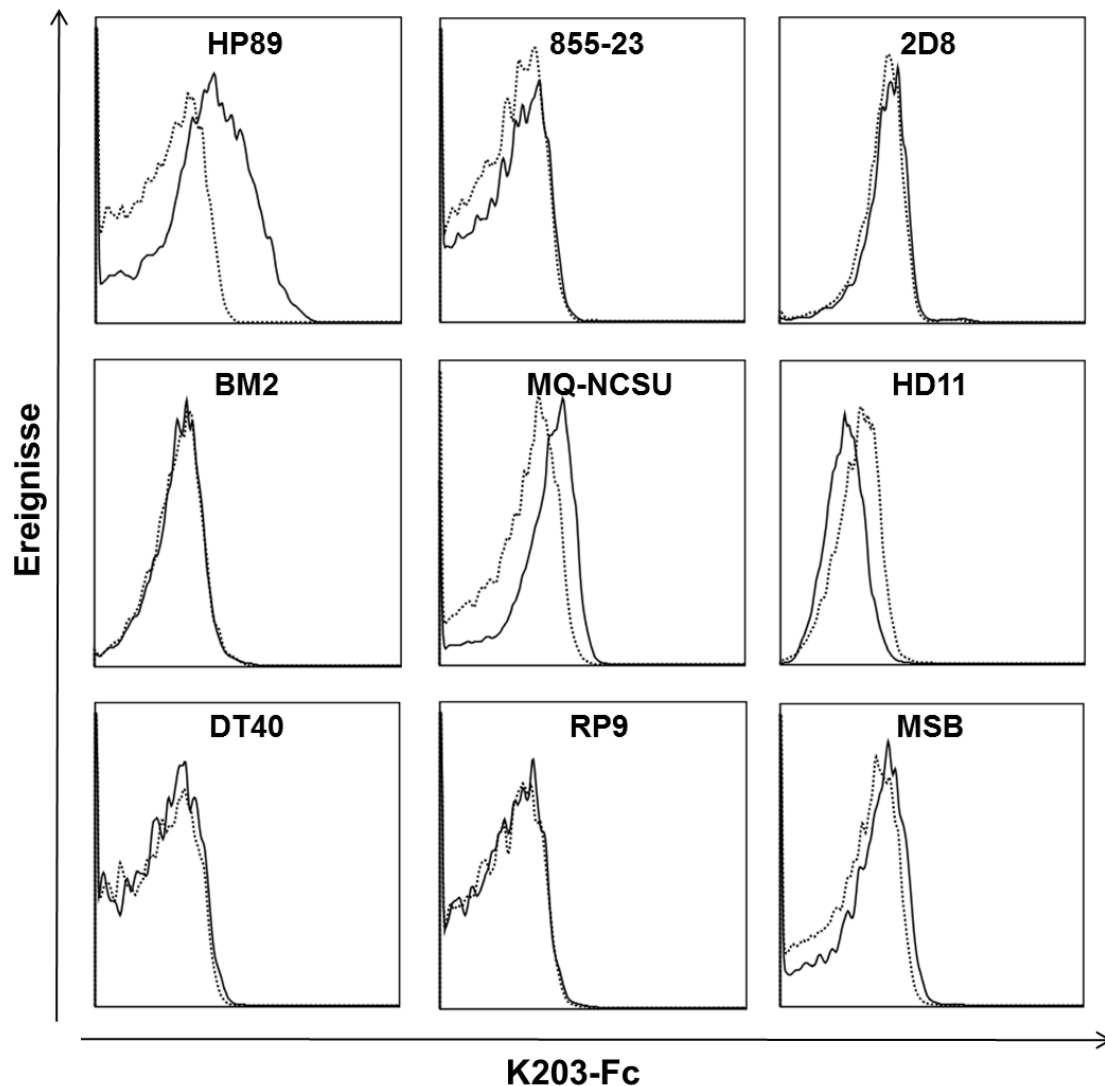
A) Darstellung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> sowie der CD4/CD8 doppelt positiven Population an T-Zellen des Thymus. B) Anteil der K203-R<sup>+</sup> Zellen an der CD4/CD8 doppelt positiven T-Zell-Population. C) Anteil der K203-R<sup>+</sup> Zellen an der CD4 einfach positiven T-Zell-Population. D) Anteil der K203-R<sup>+</sup> Zellen an der CD8 einfach positiven T-Zell-Population.



Es zeigte sich, dass diese doppelt positiven Vorläuferzellen K203-hu-Fc nicht binden konnten (0,12%), während Subpopulationen ausgereifter CD4 (12,1%) und CD8 (7,39%) einfach positiver T-Zellen im Thymus wiederum eine Bindung des Chemokins zeigten. Für doppelt negative Zellen konnte keine Bindung von K203-hu-Fc nachgewiesen werden.

### 5.6.3 Test verschiedener Zelllinien auf K203-Bindung

Da es für eine weitere *in vitro* Charakterisierung von K203 natürlich sehr nützlich ist, mit Zelllinien arbeiten zu können, die einen Rezeptor für K203 exprimieren, war das nächste Ziel dieser Arbeit, diverse Zelllinien auf K203-Bindung zu testen. Durchflusszytometrisch auf Bindung von K203-hu-Fc getestet wurden: HD11 Zellen (Hühnermakrophagenlinie), BM2 Zellen (myeloblastoide Hühnerzelllinie), DT40 Zellen (Hühner B-Zelllinie), MSB1 Zellen (MDV transformierte Hühnerlymphozyten), MQ-NSCU Zellen (Hühnermakrophagenlinie), RP9 Zellen (MDV transformierte Hühner B-Zellen), 2D8 Zellen (Hühnerlymphozytenlinie), 855-23 (REV-transformierte Hühner T-Zelllinie) und HP89 Zellen (MDV transformierte Hühner-T-Zelllinie). HP89 stellte sich als einzige Zelllinie heraus, die zumindest eine schwache Bindung von K203-hu-Fc zeigte. Bei MQ-NSCU Zellen sowie bei MSB1 Zellen konnte ein minimaler Shift der Fluoreszenzintensität beobachtet werden, der zwar als Hinweis auf eine geringe Zahl an K203-Rezeptoren gesehen werden kann, aber insgesamt zu schwach ist, als dass die Zelllinien für aussagekräftige *in vitro* Experimente in Frage kommen. Alle weiteren getesteten Zelllinien zeigten keine Bindung von K203-hu-Fc, tragen daher auch keinen oder zumindest keinen funktionellen Rezeptor auf ihrer Oberfläche (Abbildung 13).



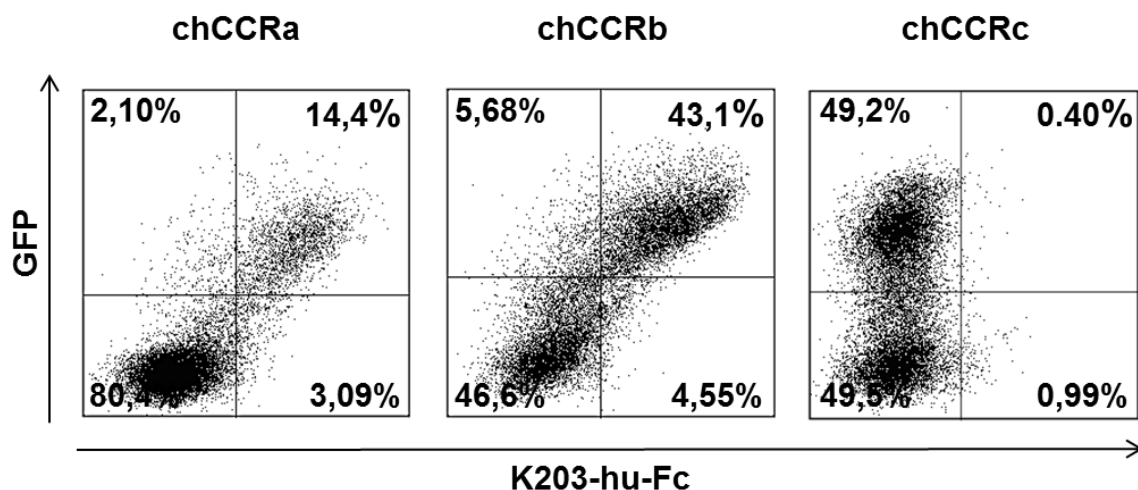
**Abbildung 13: Untersuchung zu Expression des Rezeptors von K203 auf verschiedenen Hühnerzelllinien**

Nur für die Zelllinie HP89 (MDV transformierte Hühner-T-Zelllinie) konnte eine eindeutige Bindung von K203-hu-Fc nachgewiesen werden. Die Zelllinien MQ-NCSU (Hühnermakrophagen) sowie MSB1 (MDV transformierte Hühnerlymphozyten) zeigten zwar einen schwachen Shift, der jedoch nur als Hinweis auf eine eventuell sehr schwache Expression des K203-Rezeptors gesehen werden kann.

## 5.7 Bindungsstudien zu den Rezeptoren chCCRa, chCCRb und chCCRc

In den bisherigen durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde immer nur die Bindung des Chemokins K203 an verschiedene Zellpopulationen untersucht und damit das Vorhandensein eines Rezeptors aufgezeigt. Aufgrund von Sequenzanalysen und den dadurch bekannten Homologien zu humanen Rezeptoren kann allerdings angenommen werden, dass für K203 drei mögliche Rezeptoren existieren. Diese wurden, wie bereits weiter oben beschrieben, als chCCRa, chCCRb und chCCRc bezeichnet. Für die weitere Charakterisierung der Rezeptoren wurden alle drei Kandidatengene kloniert und exprimiert. Als Vektor wurde für alle drei Rezeptoren pEGFP-N1 gewählt. Dieser Vektor

enthält eine GFP-Sequenz, so dass stabil transfizierte Zellen durch ihre grüne Fluoreszenz direkt im Durchflusszytometer detektiert werden können, was die Selektion erleichtert. Die Sequenzen der drei Rezeptoren konnten aus bestehenden Konstrukten, die freundlicherweise vom Roslin Institute & R(D)SVS, University of Edinburgh zur Verfügung gestellt wurden, durch Restriktionsenzymverdau herausgeschnitten werden um sie mit dem GFP-Vektor zu ligieren. Für eine transiente Transfektion wurde die humane Nierenfibroblasenlinie HEK293T gewählt. Zwei Tage nach Transfektion konnten die drei Zelllinien chCCRa-GFP-HEK293T, chCCRb-GFP-HEK293T und chCCRc-GFP-HEK293T mit K203-hu-Fc gefärbt werden. Nach Detektion mit dem sekundären Antikörper goat-anti-huIgG(Fc) Alexa Fluor 647 zeigte sich im Durchflusszytometer folgendes Bild:



**Abbildung 14: Studie zur K203-Bindung an die Rezeptorkandidaten chCCRa, chCCRb und chCCRc**

Sowohl die Zelllinie chCCRa-GFP-HEK293T als auch die Zelllinie chCCRb-GFP-HEK293T waren in der Lage K203-hu-Fc zu binden. Die Zelllinie chCCRc-GFP-HEK293T hingegen zeigte keine Bindung des Chemokins. Die nicht abgebildete Kontrolle (Färbung von K203-hu-Fc auf pEGFP-N1 transfizierten HEK293T) zeigte dasselbe Bild wie für chCCRc-GFP-HEK293T dargestellt. Eine Kontrolle aus untransfizierten HEK293T war doppelt negativ.

Eine eindeutige Bindung von K203-hu-Fc konnte somit für die Rezeptoren chCCRa und chCCRb nachgewiesen werden. Diese beiden Rezeptoren besitzen eine hohe Sequenzhomologie zueinander und werden in phylogenetischen Analysen als mögliche Orthologe von vier humanen Chemokinrezeptoren gesehen (CCR1, CCR2, CCR3 und CCR5), da sie im Hühnergenom auf dem äquivalenten Locus zu finden sind [9]. Der dritte mutmaßliche Rezeptor chCCRc, der sich in der Sequenz etwas deutlicher von den anderen beiden unterscheidet, war nicht in der Lage, K203-hu-Fc zu binden (Abbildung 14). Dieser

liegt beim Huhn allerdings in einer anderen genomischen Region in der beim Menschen CCR8 codiert ist [9].

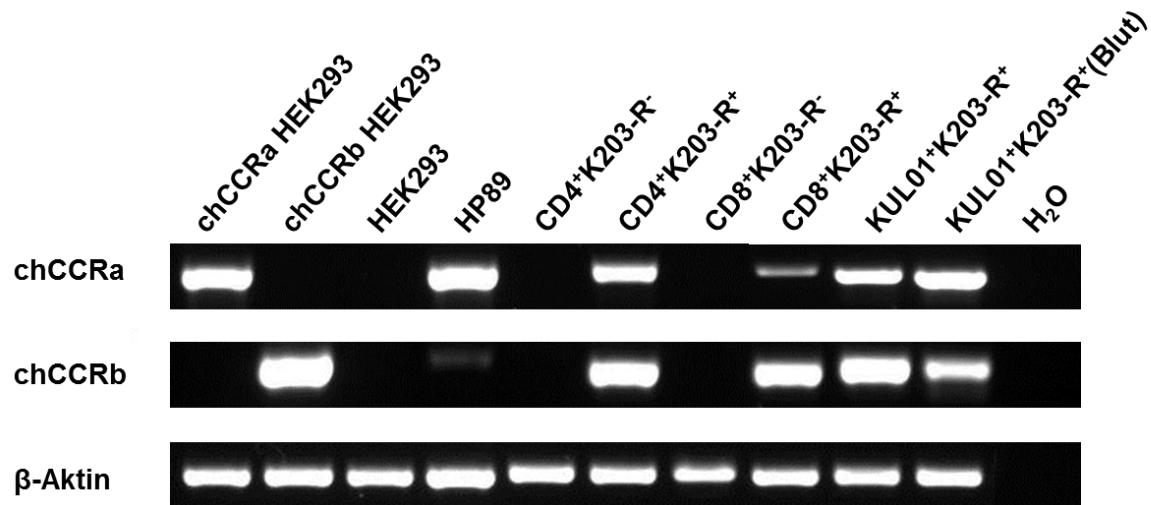
Nicht abgebildet ist die Färbung von K203-hu-Fc auf pEGFP-N1-Vektor transfizierten 293T. Diese Färbung zeigt im Durchflusszytometer das gleiche Bild wie die Zelllinie chCCRC-GFP-293T. Somit konnten chCCRa und chCCRb eindeutig als Rezeptoren für das Chemokin K203 identifiziert werden.

## 5.8 Analyse der Expression von chCCRa und chCCRb in verschiedenen Zellpopulationen

Das Fusionsprotein K203-hu-Fc war für eine Unterscheidung der Rezeptoren auf den ansprechbaren Zellen ungeeignet, da es, wie zuvor beschrieben, an beide Rezeptoren bindet. Aufgrund der verschiedenen K203-bindenden Zellpopulationen stellte sich jedoch die Frage, ob auch die Verteilung der Rezeptoren auf den entsprechenden Zellen Unterschiede aufweist. Um diese Fragestellung klären zu können wurden für chCCRa und chCCRb Primer für die RT-PCR kreiert (siehe Tabelle 4).  $\beta$ -Aktin diente als Kontrolle. Für die Gewinnung reiner Zellpopulationen wurde die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung genutzt. Eine Hühnermilz bzw. Hühnerblut wurde wie in 4.2.3 beschrieben präpariert und mit den jeweiligen Antikörpern (siehe Tabelle 9) angefärbt (siehe 4.18.1). Mithilfe der Software des Durchflusszytometers *FACSariaII* wurden die entsprechenden Zellpopulationen eng eingegrenzt und im Anschluss anhand ihrer unterschiedlichen Fluoreszenz sortiert. Aus der Milz wurden folgende Zellpopulationen sortiert:  $CD4^+ K203-R^-$ ,  $CD4^+ K203-R^+$ ,  $CD8^+ K203-R^-$ ,  $CD8^+ K203-R^+$ . Aus dem Blut wurden ausschließlich die Monozyten ( $KUL01^+ K203-R^+$ ) sortiert, da für diese Zellpopulation eine Bindung von K203-hu-Fc nachgewiesen war. Die Entscheidung, die T-Zell-Populationen aus der Milz zu sortieren, hatte ausschließlich praktische Gründe. Die höhere Frequenz an Milz-T-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung sichert eine schnellere Sortierung und damit auch das Überleben der sortierten Zellen.

An die Sortierung schloss sich direkt die RNA-Isolierung an. Als Positiv-Kontrollen wurde RNA aus den Zelllinien chCCRa-HEK293 und chCCRb-HEK293 isoliert. Diese stabilen Zelllinien wurden ursprünglich auch für die Durchflusszytometrie generiert, trugen aber, wie sich im Verlauf der Studien zeigte, ein fehlerhaftes GFP (in Tabelle 4 sind die genutzten Primer mit \* markiert). Als Negativ-Kontrolle diente die untransfizierte Zelllinie HEK293. Da die Zelllinie HP89 ebenfalls eine Bindung von K203-hu-Fc gezeigt hatte, wurde auch diese in die Auswahl miteinbezogen.

Die anschließende RT-PCR zeigte auf dem Agarosegel folgendes Bild, das auch eine semiquantitative Aussage zulässt (Abbildung 15):



**Abbildung 15: RT-PCR-Analyse der Expression von chCCRa und chCCRB in verschiedenen Zelllinien und Zellpopulationen**

Die Positiv-Kontroll-Zelllinien chCCRa-HEK293 und chCCRB-HEK293 sowie die Negativ-Kontrolle HEK293 dokumentieren die Spezifität der Primer. Die Zelllinie HP89 exprimiert hauptsächlich chCCRa, jedoch ist auch eine geringe chCCRB-Expression zu beobachten. Zellpopulationen, die im Durchflusszytometer kein K203-hu-Fc binden konnten, stellten sich auch in der PCR als negativ für die beiden Rezeptoren heraus. Die bekannten K203-hu-Fc-bindenden Populationen zeigten jeweils eine Expression beider Rezeptoren.

Wie erwartet konnte bei den beiden Zelllinien chCCRa-HEK293 und chCCRB-HEK293 nur die Bindung des jeweiligen Primers nachgewiesen werden. Auf untransfizierten HEK293 konnten für beide Primer keine Amplifikate nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt deutlich die Spezifität der Primer. Für die Zelllinie HP89, die in durchflusszytometrischen Messungen als einzige Zelllinie eine eindeutige Bindung von K203-hu-Fc zeigte, konnte auch in der RT-PCR das Vorhandensein der entsprechenden Rezeptoren bestätigt werden. Interessant ist hierbei, dass HP89 Zellen scheinbar überwiegend chCCRa exprimieren und kaum chCCRB.

Bei den sortierten Zellpopulationen, die K203-R negativ waren (CD4<sup>+</sup> K203-R<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup> K203-R<sup>-</sup>), konnte auch die RT-PCR keinen Nachweis der Rezeptoren chCCRa und chCCRB erbringen. Die jeweils positiven Populationen in der Milz (CD4<sup>+</sup> K203-R<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> K203-R<sup>+</sup>) sowie im Blut (KUL01<sup>+</sup> K203-R<sup>+</sup>) wiesen alle eine Expression beider Rezeptoren auf. Bei der CD8<sup>+</sup> K203-R<sup>+</sup> Population scheint chCCRB jedoch weitaus stärker exprimiert zu sein.

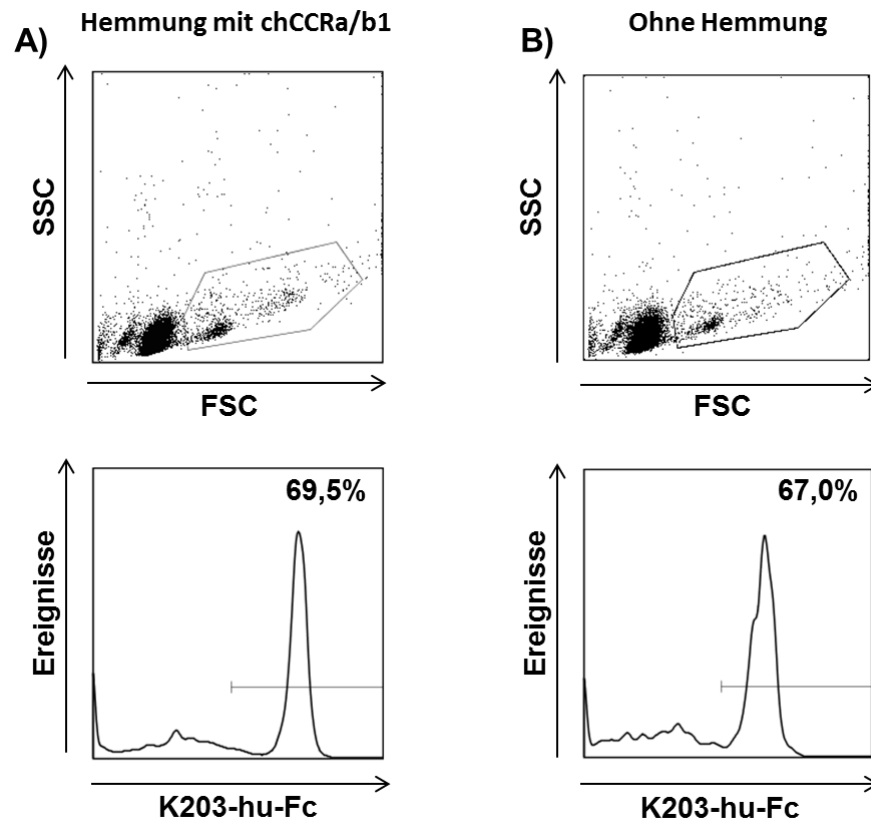
## 5.9 Generierung monoklonaler Antikörper gegen chCCRa und chCCRb

Für die Herstellung zweier monoklonaler Antikörper gegen chCCRa und chCCRb wurden zwei Balb/c-Mäuse jeweils im Abstand von drei Wochen dreimalig mit  $1 \times 10^8$  Zellen der beiden Zelllinien chCCRa-HEK293 und chCCRb-HEK293 immunisiert. Unglücklicherweise verstarb eine Maus nach einigen Wochen, so dass die Fusion nur noch mit der mit chCCRb immunisierten Maus durchgeführt werden konnte. Nach Fusion der Milzzellen dieser Balb/c-Maus mit SP2/0-Zellen wurden die entstandenen Hybridome durchflusszytometrisch charakterisiert. Ein erstes Screening erfolgte direkt auf primären Hühnerblutzellen. Alle weiteren Screenings wurden auf den Zelllinien chCCRa-HEK293, chCCRb-HEK293 und chCCRC-HEK293 durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle Antikörper nicht nur chCCRb zu binden vermochten, sondern auch an chCCRa banden. Am Ende der Selektion lagen zwei Klone vor, die chCCRa/b1 und chCCRa/b2 genannt wurden. Diese Klone binden spezifisch an chCCRa und chCCRb, nicht jedoch an chCCRC.

Um die Monoklonalität der Antikörper sicherzustellen wurden beide Klone subkloniert und analog getestet. Die darauf folgende Isotyp-Bestimmung ergab IgG1 für chCCRa/b1 und IgG3 für chCCRa/b2. Die weiteren beschriebenen Untersuchungen wurden alle mit chCCRa/b1 durchgeführt.

Ein erster Augenmerk lag auf der Untersuchung der blockierenden Eigenschaften von chCCRa/b1. Hierzu wurden PBMCs aus Hühnerblut 20 Minuten entweder mit chCCRa/b1 oder PBS inkubiert. In einem 2. Färbeschritt wurden die Zellen ebenfalls für 20 Minuten mit K203-hu-Fc inkubiert, welcher in einem letzten Färbeschritt mit dem goat-anti-hu-Fc Alexa 647 dedektiert wurde. In der dargestellten durchflusszytometrischen Messung der angefärbten Monozytenpopulationen zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen mit chCCRa/b1 blockierten und nicht blockierten Zellen.

Die monoklonalen Antikörper chCCRa/b1 und chCCRa/b2 wurden in dieser Arbeit nicht mehr näher charakterisiert. Dies wird aber Gegenstand weiterer Forschungsarbeit sein.



**Abbildung 16: Durchflusszytometrische Untersuchung zur Hemmaktivität von chCCRα/b1**

PBMCs wurden entweder mit chCCRα/b1 oder mit PBS inkubiert und anschließend mit K203-hu-Fc gefärbt. Die oberen Abbildungen zeigen jeweils das Fenster, welches um die Monozytenpopulation gesetzt wurde. In den Histogrammen sind die Frequenzen der K203-hu-Fc positiven Monozyten in diesem Fenster dargestellt. In Abbildung A) wird die Frequenz an K203-hu-Fc positiven Monozyten nach Hemmung der Rezeptoren mit chCCRα/b1 veranschaulicht. Das Histogramm der Abbildung B) zeigt die Frequenz an K203-hu-Fc positiven Monozyten ohne vorangegangene Hemmung

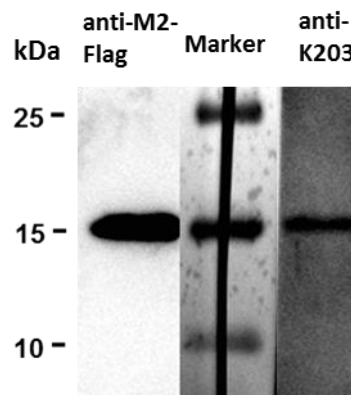
### 5.10 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen K203 im Kaninchen

Die Herstellung eines polyklonalen Antiserums hat den praktischen Vorteil, dass es im Vergleich zur Generierung monoklonaler Antikörper oftmals weniger zeitaufwändig ist.

Nach einem mehrwöchigen Immunisierungsprogramm mit aufgereinigtem K203-Flag (siehe 4.6) wurden dem Kaninchen mehrere Milliliter Blut abgenommen und daraus das Serum gewonnen. Durch die anschließende Aufreinigung über eine IgG bindende ProteinA-Sepharose-Säule sollte ein reines polyklonales Antiserum gegen K203 zur Verfügung stehen (siehe 4.9).

Getestet wurde der polyklonale rabbit-anti-K203 erstmals im Westernblot auf aufgereinigtem und konzentriertem K203-Flag. Zur Positivkontrolle wurde ein anti-M2-Flag-POD Antikörper eingesetzt. Mit dem Nachweis einer Einzelbande bei etwa 17kDa, was dem berechneten Molekulargewicht von K203-Flag entspricht, stand das polyklonale

Antiserum gegen K203 für zukünftige *in vitro* und *in vivo* Versuche zur Verfügung. Dieser Nachweis ist in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Western Blot zum Test von rabbit-anti-K203**

Aufgereinigtes K203-Flag wurde auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen und mit einem mouse-anti-M2-Flag POD detektiert. Das Antiserum gegen K203 wurde 1:400 verdünnt und mit einem goat-anti-rabbit IgG detektiert. Beide Banden liegen bei dem errechneten Molekulargewicht von etwa 17 kDa.

## 5.11 Migrationsassays

Aufgrund der Homologie zu humanem CCL16 kann auch für das aviäre Chemokin K203 eine chemotaktische Funktion angenommen werden. Dazu muss der Beweis erbracht werden, dass K203 in der Lage ist, rezeptortragende Zellen zur Migration zu bewegen.

Für einen ersten Ansatz wurde die Zelllinie HP89 ausgewählt, für die in vorangegangenen Untersuchungen der Nachweis der Rezeptoren, vorwiegend chCCRa, erbracht werden konnte.

### 5.11.1 K203-abhängige Migration von HP89 Zellen

Grundsätzlich ist bei der Durchführung von Migrationsassays darauf zu achten serum- und endotoxinfrei zu arbeiten, da unspezifische Migration durch sehr viele Substanzen ausgelöst werden kann. Dies gilt in gleichem Maß für jegliche Art von Tags, die an die jeweiligen Sequenzen angehängt werden um beispielsweise bei Fehlen von spezifischen Antikörpern dennoch den Nachweis des Proteins ermöglichen können. Somit konnten für die Durchführung des Migrationsassays nur serumfrei kultivierte und mit dem Plasmid K138 transfizierte Zellen verwendet werden. Die transienten Transfektionen wurden wie in 4.16.1 beschrieben durchgeführt, allerdings wurden die 293T Zellen einige Tage zuvor auf serumfreies HEK-Medium umgestellt. Zeitlich wurden die Transfektionen so geplant, dass



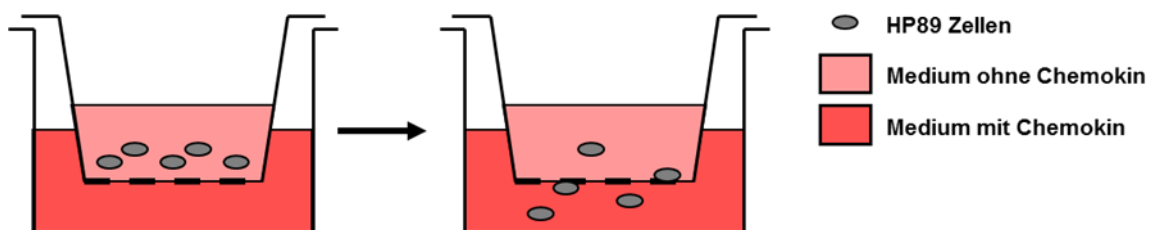
direkt am Tag der Durchführung der Migrationsassays die frischen Zellkulturüberstände vorlagen um jeglichen Verlust der biologischen Chemokinaktivität auszuschließen.

Der chemokinhaltige Zellkulturüberstand wurde dann in folgenden Verdünnungen in das untere Kompartiment der Transwellkammer eingefüllt: 1:2, 1:10, 1:50, 1:250 und 1:1250.

Zur Auswertung wurde immer eine 100% Kontrolle sowie eine Chemokinesiskontrolle, die die Grundmigration nur zum Medium widerspiegelt, mitgeführt. Jede Kontrolle und Verdünnungsstufe wurde als Triplet angesetzt.

Die in serumhaltigem Medium kultivierten HP89 Zellen wurden vor Verwendung 2-3 mal in RPMI 1640 gewaschen um Serumreste zu entfernen und danach in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen in das obere Kompartiment der Transwellkammer gegeben.

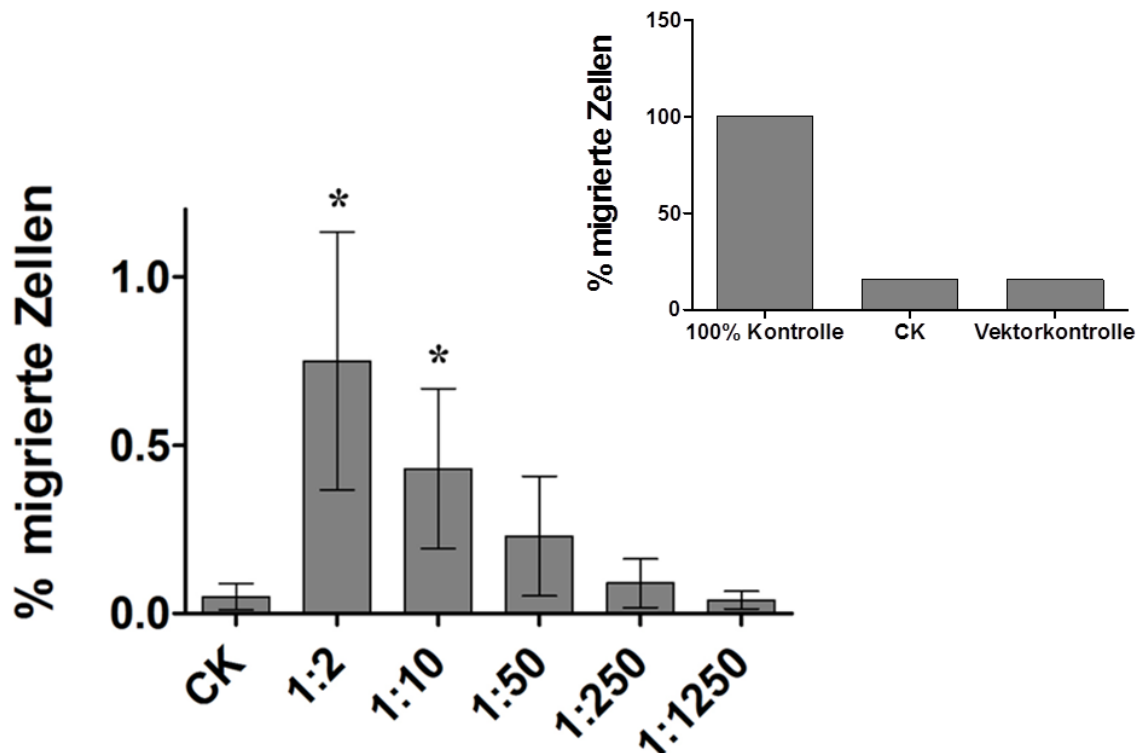
Nach einer Migrationszeit von 90 min bei 40°C und 5%CO<sub>2</sub> wurden 500µl aus dem unteren Kompartiment entnommen und zur durchflusszytometrischen Quantifizierung in *BD FACS Trucount Tubes* überführt.



**Abbildung 18: Versuchsaufbau Migrationsassay (modifiziert nach Florian Busalt [7])**

Im oberen Kompartiment befindet sich eine definierte Konzentration an HP89 Zellen in serumfreiem Chemotaxis-Medium. In das untere Kompartiment wurden verschiedene Chemokinverdünnungen, ebenfalls in serumfreiem Chemotaxis-Medium titriert, verbracht. Die Porengröße des mit Fibronektin beschichteten Inserts betrug 5µm, die Migrationszeit 90 Minuten.

Um jegliche Gefahr einer Migrationsauslösung durch Vektorbestandteile oder Inhaltsstoffe der eingesetzten Medien auszuschließen, wurde derselbe Versuchsaufbau mit dem aviären Chemokin chCXCR5, das in denselben Vektor kloniert war, durchgeführt (Abbildung 19). Somit konnte die erfolgte Migration der HP89 Zellen auch tatsächlich auf das Vorhandensein des Chemokins K203 zurückgeführt werden.



**Abbildung 19: Migration von HP89 Zellen zu verschiedenen K203-Konzentrationen**

Insgesamt wiesen die HP89 Zellen nur geringe Motilität auf, dennoch konnten bei den Verdünnungsstufen 1:2 und 1:10 signifikant höhere Zellzahlen gemessen werden. CK steht für Chemokinesiskontrolle und spiegelt die Grundmigration zum Medium wieder. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde in drei unabhängigen Experimenten durchflusszytometrisch ermittelt. Die Abbildung oben rechts zeigt die Vektorkontrolle (chCXCR5 in pcDNA3) im Vergleich zur 100% Kontrolle und der Chemokinesiskontrolle.

Mit einer extrem niedrigen Grundmotilität von 0,05% scheinen die HP89 Zellen insgesamt eher unbeweglich zu sein. Dennoch konnte bei den Verdünnungsstufen 1:2 mit 0,75% und 1:10 mit 0,43% eine signifikant höhere Zellzahl nachgewiesen werden. Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, dass das Chemokin K203 auch tatsächlich chemotaktische Aktivität aufweist.

Als nächster Schritt sollte daher ein Migrationsassay mit primären Zellen durchgeführt werden.

### 5.11.2 K203-abhängige Migration von primären Hühnermakrophagen

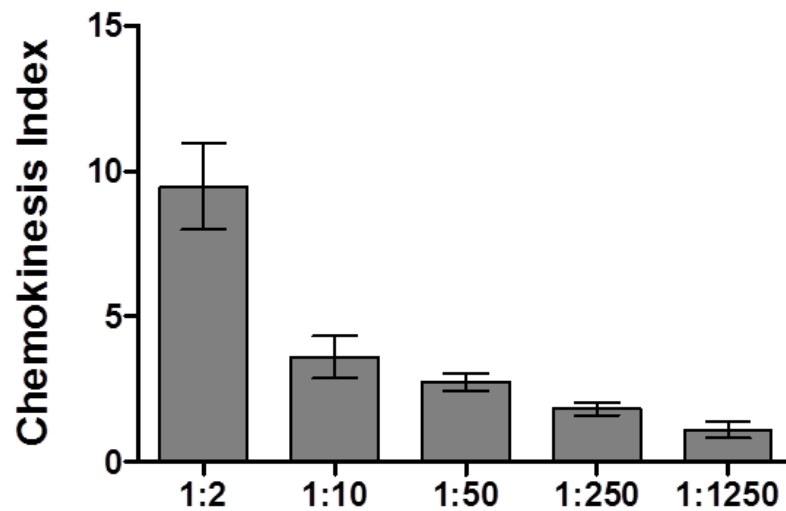
Um eine möglichst reine Monozytenpopulation zu erhalten wurden diese mittels MACS-Separation aus Hühnerblut isoliert (siehe 4.18.2) und durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit geprüft. In allen drei durchgeführten Assays lag die Reinheit bei über 97% (ohne Abbildung). Die Monozyten wurden jeweils direkt vor Ansetzen des Migrationsassays sortiert, in einer 1:2 Mischung von Chemotaxis-Medium und serumfreiem HEK-Medium

aufgenommen und im Anschluss direkt in den Assay eingesetzt. Die Zugabe von serumfreiem HEK Medium stellte sich als essentiell für das Überleben der Monozyten während der 16-stündigen Migrationszeit heraus.

Die Verdünnungen der ebenfalls frisch generierten Zellkulturüberstände der K203-transfizierten HEK293T wurden analog zum HP89-Assay hergestellt. Jedoch wurde hier darauf geachtet, dass das Verhältnis serumfrei zu Chemotaxis-Medium in allen Verdünnungsstufen immer 1:2 war. Die eingesetzte Menge an serumfreiem K203-haltigem Zellkulturüberstand wurde also immer mit einer entsprechenden Menge an serumfreiem HEK293-Medium aufgefüllt und dann 1:2 mit Chemotaxismedium verdünnt.

Da für Monozyten bzw. Makrophagen eine Migrationszeit von 12-24h angeraten wird [130], wurde der Assay für 16 Stunden bei 40°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Inserts entfernt und die migrierten Zellen wurden vor dem Abschaben und Überführen in *FACS TruCount Tubes* mikroskopisch beurteilt. Dabei fiel besonders auf, dass sich die Zellen der ersten drei Verdünnungsstufen morphologisch als ausdifferenzierte Makrophagen zeigten. Dies war auch in den weiteren Chemokinverdünnungen zu sehen, jedoch nicht mehr so ausgeprägt. Bei den Zellen der 100% Kontrolle konnte nicht die typische Spiegeleiform von ausdifferenzierten Makrophagen beobachtet werden.

Bei der Messung im *FACS AriaII* wurde diese Beobachtung dann eindrucksvoll bestätigt. Die Anzahl der lebenden Makrophagen der 1:2 Verdünnung überstieg bei Weitem die der 100% Kontrolle. Alle weiteren Verdünnungsstufen sowie die Chemokinesiskontrolle konnten dann aber anhand ihrer Viabilität gut auf die 100% Kontrolle bezogen werden. In der Auswertung können die Werte dann aber ausschließlich über den Chemokinesis-Index dargestellt werden, da die Darstellung in „% migrierte Zellen“ nicht möglich ist, da sich diese auf die 100% Kontrolle beziehen muss. Würde man die Darstellung so wählen, wären 422% der Monozyten in der 1:2 Verdünnung gewandert, was so ja nicht möglich ist. Dieser Wert wird ausschließlich durch die sehr viel höhere Viabilität der Zellen dieser Verdünnungsstufe bedingt. Eine signifikante Migration konnte bis zu einer Verdünnung der chemokinhaltigen Zellkulturüberstände von 1:250 nachgewiesen werden.



**Abbildung 20: Migration von primären Monozyten/Makrophagen zu verschiedenen K203-Konzentrationen**

Eingesetzt wurde eine über 97% reine Monozytenkonzentration, die über eine MACS Sortierung gewonnen wurde. Eingesetzt wurden aufgrund der Größe der Zellen nur  $1 \times 10^6$  Zellen pro Transwellkammer. Die Migrationszeit betrug 16 Stunden bei  $40^\circ\text{C}$  und  $5\%\text{CO}_2$ . Dargestellt ist der Chemokinesis-Index (Anzahl migrierter Zellen der jeweiligen Probe geteilt durch die Anzahl migrierter Zellen in der Chemokinesiskontrolle).

## 6 DISKUSSION

Die Abwehr von Infektionen ist ein genau koordiniertes Zusammenspiel verschiedenster Zellgruppen, Botenstoffe und Signalmoleküle, deren Interaktion perfekt abgestimmt sein muss. Nicht nur die Art des Pathogens, sondern auch eine Vielzahl anderer Parameter wie der Infektionsort, die Infektionsdosis und die Pathogenität des Erregers oder auch das Alter des Patienten spielen für das Auslösen einer effizienten Immunantwort eine große Rolle.

Als erste Verteidigungslinie stehen dem Körper eine ganze Reihe von Mechanismen der angeborenen Immunantwort zur Verfügung. Seit etwa 30 Jahren weiss man, dass Chemokine in diesem Zusammenhang eine ganz zentrale Rolle spielen. Mit der Entdeckung des ersten Chemokins im Jahre 1983, das anfänglich zu den Zytokinen gezählt wurde, wurde sehr schnell deutlich, dass sich der Immunologie hier ein ganz neues Forschungsgebiet erschlossen hatte [18-20].

Bei Mensch und Maus sind heute über 50 Chemokine und etwa halb so viele Rezeptoren bekannt [21, 22]. Nahezu alle wurden schon einer näheren funktionellen Betrachtung unterzogen. Da sich das Huhn entwicklungsgeschichtlich vor etwa 300 Millionen Jahren vom Säuger abgespalten hat und seitdem unabhängig weiterentwickelt hat, besteht ein nicht unerheblicher Unterschied zum Chemokinrepertoire der Säuger. Das Verständnis des aviären Chemokin-Systems basiert fast ausschließlich auf genomischen Analysen und Interpretation von Sequenzähnlichkeiten im Vergleich zu den Säuger-Chemokinen. Für die Chemokine, die beim Säuger als homöostatische Chemokine gelten, sind auch beim Huhn direkte Homologe beschrieben, wenn auch das Huhn insgesamt ein sehr viel kleineres Repertoire an Chemokinen aufweist [5-7, 9, 80, 82]. Für Chemokine mit hauptsächlich inflammatorischen Funktionen ist dies um einiges schwieriger, da eine präzise Zuordnung aufgrund des sehr unterschiedlichen Repertoires und fehlender Rezeptorcharakterisierung nahezu unmöglich ist. Gerade jedoch diese Rezeptor/Ligand Interaktionen sind wichtig für ein umfassendes Verständnis von Wirkungsweise und Vorkommen der Chemokine sowie zur Definition ihrer Zielzellen.

In den letzten Jahren ist in diversen Expressionsstudien, besonders aber bei mukosalen Infektionen mit *Salmonella* oder *Eimeria*, das Chemokin K203 besonders aufgefallen [10-14]. Es gehörte immer zu den mit am stärksten induzierten Genen im Darmgewebe. K203 wird nach aktuellen genomischen Untersuchungen als Ortholog des humanen CCL16 gesehen [9]. Da CCL16 in der Maus nur als Pseudogen vorliegt, stellt diese Arbeit die erste Charakterisierung eines möglichen CCL16 Homologs dar [17].

## 6.1 Genexpressionsanalysen von K203 *in vitro*

Das Chemokin K203 wurde erstmalig in LPS stimulierten HD11 Zellen, einer Hühner-Makrophagen Linie, nachgewiesen [8]. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass auch primäre Makrophagen des Huhnes K203 nach LPS Stimulation hochregulieren [14, 87]. Hieraus ergab sich die Fragestellung welche weiteren Liganden der verschiedenen *Pattern Recognition Receptors* eine vermehrte K203 Expression auslösen können. Dazu wurden Makrophagen aus dem Blut von Hühnern kultiviert und nach Erhalt einer reinen Kultur mit einer Reihe von TLR-Liganden sowie Muramyl-dipeptid und rekombinantem IFN $\gamma$  stimuliert (siehe Tabelle 3). LPS, der Ligand des *Toll-like-Receptor 4* (TLR-4), führte, wie zu erwarten, zu einer starken, in diesem Falle über 580fachen Hochregulierung der K203 mRNA Expression. Dieses Maximum wurde bereits 3 Stunden nach Stimulation der Zellen gemessen. Im Laufe der weiteren Messungen 6 und 16 Stunden *post stimulationem* (p.s.) fielen die Expressionswerte wieder ab, blieben aber gegenüber der unstimulierten Kontrolle auch zu diesen Zeitpunkten signifikant erhöht.

Der Ligand von TLR-21, dem Ortholog zum TLR-9 des Säugers [131], war ebenfalls in der Lage sehr hohe Expressionswerte von K203 zu induzieren. Diese zeigten aber eine etwas andere Kinetik. Im Gegensatz zu LPS wurde der Peak der K203 Expression erst nach 6 Stunden erreicht. Dies kann möglicherweise mit der Rezeptor-Lokalisation in Zusammenhang stehen. TLR-4 wird auf der Zelloberfläche exprimiert, ist damit direkt zugänglich, während TLR-21 intrazellulär CpG-Motive erkennt, somit also zunächst eine Aufnahme des Liganden in die Zelle notwendig ist. Eine moderate Induktion von K203 konnte nach Stimulation mit Poly I:C und R848, beides Moleküle, die virusassoziierte molekulare Muster imitieren, beobachtet werden. Beides sind ebenfalls Liganden endosomal lokalisierter TLRs, nämlich TLR-3 und TLR-7. IFN $\gamma$ , das potenteste makrophagenaktivierende Zytokin, war ebenfalls in der Lage eine leichte Hochregulierung von K203 zu bewirken. Die Liganden von TLR-2, TLR-5 und TLR-6 konnten keine Veränderung der Expressionswerte von K203 induzieren.

Diese Ergebnisse bestätigen bekannte Daten aus der Literatur, wonach eine starke Induktion von K203 in der Milz nach einer Infektion mit Marek-Viren beobachtet werden konnte [85]. Die Hochregulierung von K203 nach Salmonelleninfektion kann ebenfalls durch diese Daten erklärt werden, da LPS und CpG-Motive klassischerweise mit gram-negativen Bakterien assoziiert sind und gerade diese beiden Stimulanten den größten Effekt zeigten [132]. Flagellin (TLR-5), das für die begeißelten Salmonellen ebenfalls typisch ist [133], konnte bei den kultivierten Makrophagen keine K203-Induktion auslösen.

Dies lässt allerdings nicht den Schluss zu, das Flagellin grundsätzlich nicht in der Lage ist eine Induktion von K203 zu bewirken. Diese Daten wurden durch Stimulation von Makrophagen gewonnen, die aus Blut kultiviert wurden. TLR-5 konnte bisher nicht auf aviären Monozyten nachgewiesen werden [134], was in diesem Fall auch der Grund für die fehlende Chemokin-Induktion sein kann. Grundsätzlich besteht auch im Hinblick auf die Expression von TLRs auf aviären Makrophagen wiederum das Problem, dass der Wissensstand beim Huhn noch sehr lückenhaft ist. Auch hier beruhen die meisten Informationen auf genomischen Analysen und mRNA Daten, die aber nie die Expression eines tatsächlich funktionellen Rezeptors bestätigen können. Zudem kann auch die *in vitro* Kultivierung immer zu einer Veränderung des Rezeptor-Expressionsprofils führen.

Vergleicht man diese Daten mit dem vermuteten humanen Ortholog CCL16, so kristallisieren sich einige Gemeinsamkeiten heraus. CCL16 wird durch IL-10, LPS und IFN $\gamma$  in Monozyten/Makrophagen induziert [92, 96]. Daten zu IL-10 liegen für das Huhn zwar nicht vor, jedoch konnte hier für LPS und IFN $\gamma$  eine Induktion des Chemokins K203 in Makrophagen bestätigt werden.

## 6.2 Genexpressionsanalysen von K203 *in vivo*

Insgesamt liegen zwar einige *in vivo* Expressionsdaten zu K203 vor, jedoch wurde in keiner dieser Untersuchungen die Expressionskinetik während des Infektionsverlaufs einer näheren Betrachtung unterzogen. Da zu Salmonelleninfektionen des Huhnes einige aussagekräftige Daten existieren und die Induktion von K203 in allen Publikationen sehr deutlich war, wurde in dieser Arbeit ein *in vivo* Infektionsmodell mit einem hoch invasiven humanpathogenen Salmonellenstamm gewählt. Um sowohl die hohen Expressionswerte während einer Infektion des Huhnes mit *Salmonella* zu bestätigen als auch die Kinetik der K203-Expression zu untersuchen wurden Eintagsküken mit dem *S. Enteritidis* Stamm 147 infiziert [135]. Eine Kontrollgruppe mit derselben Anzahl an Tieren blieb unbehandelt. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Tiere getötet, das Caecalgewebe entnommen und mittels qRT-PCR analysiert. Nach 24 Stunden konnte ein starker Expressionsanstieg verzeichnet werden, der an Tag 2 *post infectionem* (p.i.) mit einer 93fachen Hochregulierung gegenüber der Kontrolle sein Maximum erreichte. Dass an den ersten beiden Messzeitpunkten zwei und sechs Stunden p.i. noch keine Änderung gegenüber der Kontrolle zu sehen war lässt sich damit erklären, dass vom Zeitpunkt der Infektion über die Einwanderung der Salmonellen ins Darmgewebe bis zur Reaktion der darmresidenten Immunzellen einige Stunden vergehen können. Die Expressionswerte blieben dann noch

signifikant hoch bis Tag 13 p.i. und erreichten auch am letzten Messzeitpunkt, dem Tag 50, immer noch nicht die Basalwerte der nicht-infizierten Kontrolle. Jedoch wurden hier die Expressionsunterschiede von K203 nicht mehr signifikant. Diese Beobachtung steht im Einklang mit bekannten Daten aus der Literatur, wonach humanpathogene Salmonellen nach Infektion noch mehrere Wochen in den Caeca der Hühner nachweisbar sind [136].

Im Vergleich hierzu wurden 22 Tage alte Broiler mit *Campylobacter jejuni* Stamm M1 infiziert. Ebenso wie *Salmonella* Enteritidis kolonisieren diese Bakterien die Caeca der Hühner, verursachen aber keine oder nur schwache klinische Symptome. Aus einem Vergleich der Cytokin- und Chemokin-Expression der frühen angeborenen Immunantwort des Huhnes auf Infektionen mit *Salmonella* und *Campylobacter* ist bekannt, dass die invasiven Salmonellen ein sehr viel breiteres Spektrum an Genen induzieren als das nicht-invasive Bakterium *Campylobacter jejuni* [137]. Gerade im Hinblick auf proinflammatorische Cyto- und Chemokine wird dieser Unterschied besonders deutlich. In der angesprochenen Studie konnte kein Expressionsanstieg proinflammatorischer Gene nach *Campylobacter jejuni* Infektion gemessen werden [137].

Aus Studien an Säugern ist bekannt, dass die Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort hauptsächlich auf der basolateralen Seite des caecalen Epitheliums stattfindet, da dort einerseits die immunopotenten Makrophagen der *Lamina propria* sitzen, andererseits auch deren TLR-Expression sehr viel höher ist. Da die Pathogenbelastung im Caecum nach *Campylobacter*-Infektion oft sogar höher ist als bei einer Salmonelleninfektion [137], scheint also tatsächlich die Invasivität eines Bakteriums für die K203-Immunantwort ausschlaggebend zu sein. Diese Beziehung spricht dafür, dass K203 eines der ersten Chemokine ist, die bei einer Infektion mit invasiven Bakterien direkt hochreguliert werden. Zudem geben die in dieser Arbeit gewonnenen Daten einen Hinweis darauf, dass die Makrophagen der *Lamina propria* für den gemessenen Expressionsanstieg von K203 verantwortlich sein könnten. Bestätigt werden könnte diese Theorie entweder durch einen monoklonalen Antikörper gegen K203 oder durch Untersuchungen mit dem polyklonalen rabbit-anti-K203 Antiserum. Gerade in der Immunohistochemie könnte dieses sehr gut eingesetzt werden. Als Alternative hierzu wäre noch die In-situ-Hybridisierung zu nennen, bei der durch eine künstlich hergestellte Sonde spezifische Nukleinsäuren in Geweben oder einzelnen Zellen nachgewiesen werden können.

Nun ist allerdings seit Kurzem bekannt, dass bei der Maus gerade die darmresidenten Makrophagen der *Lamina propria* durch das intestinale Mikromilieu einen einzigartigen Phänotyp entwickeln. So sind in gesunder Mukosa viele *pattern recognition receptors*



(PRR) herunterreguliert bzw. viele der nötigen Co-Rezeptoren gar nicht exprimiert [138]. Es wird beschrieben, dass erst die einwandernden Monozyten und Lymphozyten die letztlich protektiven proinflammatorischen Mediatoren sezernieren [138]. Ob diese neuen Informationen auch auf den Vogel zutreffend sind, ist bisher nicht geklärt.

Für diese These würde allerdings sprechen, dass die Hochregulation vieler Zytokine und Chemokine im Darm, unter anderem auch von K203, erst einige Tage nach Infektion stattfindet. Nach *Salmonella* Enteritidis Infektion konnte ein starker Expressionsanstieg von K203 bereits nach 24 Stunden gemessen werden. Ob K203 nun tatsächlich von den darmresidenten Makrophagen, oder von eingewanderten Monozyten/Makrophagen oder T-Lymphozyten produziert wird bzw. ob die Penetration von Makrophagen durch die Salmonellen deren PRR-Expressionsprofil dahingehend verändert, dass proinflammatorische Mediatoren wieder stärker reguliert sind, wäre interessant zu klären. Es bestände natürlich auch die Möglichkeit, dass andere residente Darmzellen K203 sezernieren können. Durchflusszytometrische Untersuchungen mit Darmgewebe, im Besonderen mit Caecalgewebe, bringen jedoch meist nur ungenügende Ergebnisse, da der Verdau des sehr festen Gewebes oft nicht vollständig möglich ist und deshalb schwerlich Aussagen über die tatsächlichen Zellpopulationen zulässt. Zudem wären Aussagen über das Expressionsprofil von Darmzellen nach einer so intensiven Vorbehandlung auch kritisch zu sehen. Hier könnte eine kürzlich etablierte Darmepithelzelllinie (persönliche Mitteilung B. Kaspers) zusätzliche Informationen liefern. Diese befindet sich im Moment jedoch in einem nicht abgeschlossenen Stadium der Charakterisierung, wird aber in Kürze für erste Untersuchungen zur Verfügung stehen.

### 6.3 Immunohistochemie

Parallel zu den Expressionsstudien wurden von den *S. Enteritidis* Stamm 147 infizierten Tieren Gewebeproben aus dem Caecum entnommen und mit dem monoklonalen Antikörper CVI 68.1, der Monozyten und Makrophagen detektiert, gefärbt. Es konnte eine massenhafte Einwanderung von Makrophagen beginnend 24h p.i. in das infizierte Darmgewebe gezeigt werden, deren Kinetik sich mit den Expressionsdaten von K203 deckte. Aus der Literatur ist bekannt, dass *S. Enteritidis* 147 bereits einen Tag nach Infektion in der *Lamina propria* des Caecums nachweisbar ist und dort auch bis zu sechs Wochen persistiert [106].

Diese könnte einerseits bedeuten, dass epitheliale Mukosazellen und/oder darmresidente Makrophagen durch die Salmonellenkolonisierung aktiviert werden und daraufhin das

Chemokin K203 sezernieren. Der Anstieg der K203 Konzentration könnte dann für die chemokinmedierte Migration von zirkulierenden Monocyten und/oder T-Lymphozyten in das infizierte Gewebe verantwortlich sein. Andererseits könnte dieser Anstieg, wie bereits erwähnt, jedoch auch durch die Einwanderung von Monozyten bedingt sein, die - wie gezeigt - 24h p.i. schon deutlich sichtbar wurde. Beide Theorien unterstützen in jedem Fall die These, dass K203 als wichtiges frühes Alamsignal bei mukosalen Infektionen des Huhnes angesehen werden kann, welches offensichtlich erst nach einer bakteriellen Invasion induziert wird. Weitere Untersuchungen mit anderen invasiven Bakterienstämmen könnten diese These bestätigen. Besonders interessant wären sicherlich die beiden Salmonellenserovare *S. pullorum* und *S. gallinarum*, die beim Huhn und anderen Vogelarten einen akuten Krankheitsverlauf zeigen und durch hohe Mortalitätsraten gekennzeichnet sind.

#### 6.4 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Erste Hinweise, ob Monozyten bzw. Makrophagen durch K203 zur Migration bewegt werden können, würde der Nachweis der Bindung von K203 an die jeweilige Zielzelle geben können. Dies würde implizieren, dass diese Zelle dann mit Sicherheit auch einen entsprechenden Rezeptor aufweist und würde die Theorie stützen, dass Monozyten/Makrophagen durch K203 dazu bewegt werden, ins Darmgewebe einzuwandern.

Um diesen Überlegungen nachzugehen, wurde K203 in einen Vektor kloniert, der ein humanes Fc-Tag beinhaltet und anschließend eukariotisch in HEK293 Zellen (humane Fibroblasten) exprimiert. Der gewonnene Zellkulturüberstand, der nun das Chemokin K203 mit dem Fc-Tag enthielt, konnte dann mit den zu untersuchenden Zellen inkubiert werden. Mit einem Fluorochrom-markierten anti-hu-Fc Antikörper konnten anschließend Zellen angefärbt werden, die K203-huFc gebunden haben und somit einen Rezeptor für K203 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Sowohl in peripheren mononukleären Zellen des Blutes wie auch in den Lymphozytenpopulationen der Milz konnte K203 an alle Monozyten bzw. Makrophagen binden. Ebenfalls konnte K203 als Ligand für Subpopulationen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen als auch von  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  -T-Zellen identifiziert werden. B-Zellen und Thrombozyten hingegen waren nicht in der Lage K203 zu binden. Da leider für die Differenzierung weiterer Zellpopulationen wie heterophiler Granulozyten oder NK-Zellen bisher entsprechende Marker fehlen, konnte eine weitere Klassifikation K203-R<sup>+</sup> Zellen nicht durchgeführt werden.

Da CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Subpopulationen von T-Zellen als K203-R<sup>+</sup> identifiziert werden konnten, war im Besonderen von Interesse, ob CD4/CD8 doppelt positive Vorläuferzellen im Thymus ebenfalls K203 binden können. Im Thymus reifen T-Zell-Vorläufer aus dem Knochenmark aus CD4/CD8 doppelt negativen Zellen über CD4/CD8 doppelt positive Zellen zu CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> einfach positiven T-Zellen heran. Es hat sich allerdings gezeigt, dass die doppelt positiven Zellen K203 nicht binden konnten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass erst völlig ausgereifte T-Zellen, die für die Immunabwehr bereit stehen, den Rezeptor exprimieren. Vorläuferzellen, die an einer Immunantwort noch nicht beteiligt sind, scheinen den Rezeptor vielleicht aus eben diesen Gründen noch nicht auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Dies legt die Vermutung nahe, dass die entsprechende Chemokin-Rezeptor Ausstattung erst nach abgeschlossener Reifung der T-Zellen vorliegt.

Betrachtet man die Rezeptoren von humanem CCL16, so konnten durch die hier beschriebenen Untersuchungen einige Gemeinsamkeiten entdeckt werden. So werden CCR1, CCR2, CCR5 und CCR8 beispielsweise von Monozyten/Makrophagen exprimiert [139]. CCR1 kommt zudem noch bei NK-Zellen und Memory T-Zellen vor, CCR3 bei eosinophilen und basophilen Granulozyten [139]. Interessant ist, dass CCR5 auch von Subpopulationen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird [140]. Für die richtige Lokalisation von dendritischen Zellen und aktivierten T-Zellen in den verschiedenen lymphatischen Geweben spielt unter anderem CCR8 eine wichtige Rolle [141].

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass aviäre Monozyten bzw. Makrophagen ebenfalls einen Rezeptor für das vermutete CCL16 Ortholog K203 exprimieren. Da durch die fehlenden Marker für bestimmte Zellpopulationen wie eosinophile, basophile oder heterophile Granulozyten, NK-Zellen und weitere Subpopulationen von T-Zellen eine genauere Differenzierung unmöglich war, können nur Mutmaßungen angestellt werden. Jedoch deuten sich einige Übereinstimmungen zu den humanen Rezeptoren an. Durch entsprechende Gating-Strategien konnten zumindest die heterophilen Granulozyten als K203-R<sup>+</sup> ausgeschlossen werden, was wiederum in Übereinstimmung mit Daten zu CCL16 steht [142].

Ob es einen tatsächlichen Unterschied zwischen den verschiedenen Gewebsmakrophagen und der speziellen Population der darmresidenten Makrophagen gibt, gestaltet sich in durchflusszytometrischen Untersuchungen schwierig, da diese Populationen nicht durch entsprechende spezifische Marker unterschieden werden können. Die Etablierung solcher Marker zur Unterscheidung dieser nahezu gleichen Zellpopulationen wäre sicherlich ein interessanter Aspekt für zukünftige Forschungsarbeit.

## 6.5 Die Rezeptoren chCCRa, chCCRb und chCCRc

In genomischen Analysen wurden drei mögliche Rezeptoren für K203 identifiziert und als chCCRa, chCCRb und chCCRc bezeichnet. Die ersten beiden clustern mit den humanen Rezeptoren CCR1-3 und CCR5 zusammen, während chCCRc in derselben genomischen Region wie CCR8 zu finden ist [9].

Um vergleichende Daten zur Rezeptornutzung von K203 zu erhalten wurden mithilfe der Durchflusszytometrie weitere Bindungsstudien durchgeführt. Alle drei Rezeptoren wurden als eGFP Fusionsprotein in 293T Zellen exprimiert und im Anschluss wie oben beschrieben mit K203-hu-Fc und dem Detektionsantikörper gefärbt. So konnten chCCRa und chCCRb als Rezeptoren für K203 identifiziert werden, chCCRc hingegen konnte nicht als Rezeptor bestätigt werden.

Dass die Rezeptoren auch tatsächlich auf der Oberfläche der Zellen exprimiert wurden, war im Konfokalmikroskop deutlich erkennbar. Ob der Rezeptor tatsächlich in seiner richtigen Konformation auf der Oberfläche der Zelle exprimiert wird, könnte beispielsweise durch eine röntgenkristallographische Untersuchung beurteilt werden, bei der der Rezeptor in seiner dreidimensionalen Struktur dargestellt werden kann. Diese Untersuchungen sind einerseits aber sehr teuer, andererseits gibt es nur einige wenige Institutionen in Deutschland, die diese Untersuchungsmethode anbieten. Da die dreidimensionale Struktur nicht nur dieser Rezeptoren aber bisher noch nicht exakt dargestellt wurde, wäre dies für weiterführende Forschungen auf dem Gebiet der Hühnerimmunologie sicher von Interesse.

Um den Rezeptor chCCRc aber endgültig als Rezeptor für K203 ausschließen zu können bedarf es der Klärung, ob dieser auch an die Oberfläche kommt. Ein etwas einfacherer aber nicht weniger zeitaufwändiger Ansatz wäre es, in einem weiteren geeigneten Expressionssystem die Bindung nachweisen zu können. Die Klonierung von chCCRc in einen Flag-getaggen Vektor wurde schon durchgeführt, jedoch hat sich bisher keine Zelllinie generieren lassen, die dieses Konstrukt stabil exprimiert. Ziel ist es den Rezeptor über das Flag-Tag zu detektieren und so den Beweis zu erbringen, dass dieser auch an die Oberfläche der transfizierten Zelle kommt. Verschiedene ähnliche Expressionssysteme stehen für weitere Arbeiten zur Verfügung. Jedoch sind auf diesem Gebiet noch weitere Studien nötig um diese Tatsache letztlich abschließend bestätigen zu können.

Basierend auf der unterschiedlichen Rezeptorverteilung der humanen Rezeptoren wurde mittels RT-PCR die Expression von chCCRa und chCCRb in verschiedenen

Zellpopulationen im Blut ( $CD4^+K203^-$  T-Zellen,  $CD4^+K203^+$  T-Zellen,  $CD8^+K203^-$  T-Zellen,  $CD8^+K203^+$  T-Zellen,  $Kul01^+K203^+$  Monozyten), in Milzmakrophagen und HP89 Zellen untersucht. Für die Zelllinie HP89 konnte als Einzige von neun Zelllinien eine K203-hu-Fc Bindung nachgewiesen werden. Entgegen der Erwartungen konnte kein erkennbarer Unterschied in der Rezeptorverteilung beobachtet werden. Alle Zellpopulationen exprimieren beide Rezeptoren, einzig die  $CD8^+K203^+$  T-Zellen scheinen vermehrt  $chCCRb$  zu exprimieren. Sehr klar hat sich hingegen das Rezeptorvorkommen bei den HP89 Zellen gezeigt. Hier ist  $chCCRa$  deutlich exprimiert, eine Expression von  $chCCRb$  hingegen war kaum detektierbar. Bei Zelllinien ist die Expression von Oberflächenmolekülen sehr konstant. Für die sortierten Leukozyten können hingegen individuelle Unterschiede bei der Expression der Rezeptoren vorkommen. Eventuell beeinflusst auch der Immunstatus sowie der allgemeine Gesundheitszustand der Tiere die Rezeptorexpression. Interessant wäre sicherlich, die Rezeptorverteilung sowohl bei akuten und chronischen Infektionen als auch im Infektionsverlauf zu untersuchen. Dies könnte weitere Hinweise darauf geben, welche Rolle das Chemokin K203 im Verlauf einer Infektion spielen könnte.

In der Literatur ist zudem beschrieben, dass Chemokinrezeptoren sehr häufig Heterodimere formen [143]. Dies könnte das Vorkommen beider Rezeptoren auf allen  $K203-R^+$  Leukozytenpopulationen durchaus erklären. Auch eine individuelle Verteilung von  $chCCRa$  und  $chCCRb$  auf den verschiedenen Subpopulationen innerhalb der Monozyten oder  $K203-R^+$  T-Zellen ist denkbar. Die Bindung von K203-hu-Fc an die mit  $chCCRa$  oder  $chCCRb$  transfizierten Zelllinien unterstützt diese These zumindest in der Hinsicht, dass eine Bildung von Heterodimeren nicht zwingend für die Bindung von K203 notwendig ist. Vielmehr kann jeder der beiden Rezeptoren K203 unabhängig voneinander binden.

## 6.6 Migrationsassays

HP89, eine *Marek's Disease-Virus* transformierte Hühner-T-Zelllinie [113], war von 12 getesteten Hühnerzelllinien die Einzige, die eine Bindung von K203 zeigte. Somit konnte diese Zelllinie für klassische Chemotaxisassays verwendet werden. Zudem wurden Monozyten mittels MACS-Separation aus dem Blut sortiert und ebenfalls in einem modifizierten Protokoll in Migrationsassays eingesetzt. Im speziellen Fall von K203 konnte keine definierte Konzentration des Chemokins eingesetzt werden, da der Vektor keine weiteren Merkmale wie etwa ein „Tag“ enthalten durfte, die eventuell eine Migration beeinflussen könnten. Aus eben diesem Grund war eine Aufreinigung aus dem

Zellkulturüberstand der mit K203 transfizierten HEK293T Zellen nicht möglich. Verwendet wurden daher unterschiedliche Verdünnungsstufen des Zellkulturüberstands der transfizierten HEK293T Zellen.

In drei unabhängigen Experimenten konnte für die Verdünnungsstufen 1:2 und 1:10 eine signifikante Migration der HP89 Zellen aus der oberen Kammer in die untere Kammer gemessen werden. Bei den Monozyten war das Ergebnis noch eindeutiger. Hier konnten bis zur Verdünnungsstufe 1:250 signifikant höhere Zellzahlen im unteren Kompartiment der Kammer nachgewiesen werden. Interessant war die Beobachtung, dass bei niedrigen Verdünnung von K203 Zellzahlen gemessen wurden, die weit höher lagen als die lebenden Zellen der 100% Kontrolle, die ja als Berechnungsgrundlage dient. Dies lässt vermuten, dass K203 nicht nur Migration induziert, sondern auch als wichtiger Überlebensfaktor dienen könnte. Bei der mikroskopischen Betrachtung der migrierten Zellen fiel zudem auf, dass Zellen der ersten drei Verdünnungsstufen das klassische Bild eines ausdifferenzierten Makrophagen (Spiegeleiform) zeigten, während die Makrophagen der 100% Kontrolle eher kleiner blieben und weiterhin kugeliges Aussehen aufwiesen. Diese morphologische Veränderung lässt vermuten, dass K203 in der Lage ist Monozyten/Makrophagen zu aktivieren und damit zur Differenzierung anzuregen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Chemokin K203 Migration jeweils empfänglicher Zellen auslösen kann, was als wichtiger Beweis für die tatsächliche chemotaktische Aktivität von K203 ist.

Im Zusammenspiel der Chemokine während einer Infektion übernehmen einige Chemokine durchaus auch regulatorische Kontrollfunktionen, um eine überschießende Immunantwort zu verhindern. Diese machen sich die Eigenschaft zunutze, dass verschiedene Chemokine an denselben Rezeptor binden können. Demnach können die belegten Rezeptoren nicht mehr von dem jeweiligen chemotaktischen Chemokin gebunden werden und folglich auch nicht aktiviert werden. Eine ähnliche Funktion haben auch die sogenannten *Decoy*-Rezeptoren, die ebenfalls keine Aktivierung der Zelle auslösen können aber Chemokine „wegfangen“ um die Immunreaktion zu kontrollieren.

Der Beweis, dass K203 auch chemotaktische Aktivität aufweist, zeigt demnach, dass K203 Zellen aktivieren kann, eventuell auch als Überlebensfaktor für diese Zellen dient, und somit als inflammatorisches Chemokin einen wichtigen Anteil an der aktiven Bekämpfung von Infektionen zu haben scheint.

## 6.7 Ausblick

Auf Grundlage dieser Untersuchung können zur tatsächlichen Funktionen des Chemokins K203 *in vivo* nur Hypothesen aufgestellt werden. So konnten zwar Monozyten/Makrophagen sowie Subpopulationen von T-Zellen als K203-R<sup>+</sup> identifiziert werden, es bleibt aber offen, ob diese Zellen *in vivo* auch tatsächlich aktiviert und zur Migration angeregt werden. Eine Beantwortung dieser Frage kann nur durch weitere experimentelle Ansätze *in vivo* erfolgen.

Idealerweise wäre auch zu prüfen, was es für ein Huhn bedeuten würde, kein K203 zu besitzen. Im Mausmodell wäre dieser Fragestellung vergleichsweise leicht nachzugehen, da ein Gen-*Knock-out* ein etabliertes Verfahren ist. Im Huhn gestaltet sich dies aber um einiges schwieriger, da Gen-*Knock-outs* - wie erst kürzlich gezeigt - zwar möglich sind, aber der Weg ein spezifisches Gen auszuschalten sehr aufwändig ist [144]. Es wird sicherlich noch mehrere Jahre dauern bis spezifische Knock-out-Hühner für die verschiedensten Forschungszweige zur Verfügung stehen werden.

In der Hühner-Immunologie muss demnach immer noch auf andere Methoden zurückgegriffen werden. Hierzu ist die Gewinnung eines neutralisierenden Antiserums ein geeigneter Ansatz. Noch besser ist allerdings die Herstellung eines neutralisierenden monoklonalen Antikörpers gegen K203 oder seine Rezeptoren. Diese Technik hat sich auch im Huhn schon vielfach bewährt [145-147]. Ein monoklonaler Antikörper hat den Vorteil, dass er spezifisch nur das Chemokin K203 antagonisiert. Eine anschließende Infektion z.B. mit humanpathogenen Salmonellen könnte eventuell viel schwerwiegender verlaufen, wenn K203 tatsächlich eine tragende Säule der angeborenen Immunabwehr mukosaler Infektionen wäre. Zu berücksichtigen ist dabei, dass die Rolle von K203 auch durch andere Chemokine übernommen werden könnte. Dies ist gerade bei *in vivo* Untersuchungen zu Chemokinen sehr häufig der Fall, da viele Chemokine an dieselben Rezeptoren binden und somit gleiche oder ähnliche Signalwege auslösen [142]. Ein monoklonaler Antikörper gegen K203 ist aktuell noch in Arbeit und wird in Kürze für weitere *in vitro* und *in vivo* Versuche zur Verfügung stehen.

Würden dagegen die Rezeptoren blockiert werden, könnten auch andere Chemokine nicht mehr binden, was eventuell zu einer gänzlich verschiedenen Immunreaktion führen könnte, deren Effekte aber wiederum nicht auf K203 allein zurückgeführt werden können. Zudem könnte K203 auch an weitere bisher nicht identifizierte Rezeptoren binden oder im Falle einer Bindung an Decoy-Rezeptoren oder andere atypische Chemokinrezeptoren eine ganz

andere Wirkung entfalten. Diese Umstände würden es nicht einfach machen gewonnene *in vivo* Ergebnisse zu interpretieren.

Dennoch sind monoklonale Antikörper für weitere Studien unabdingbar. Der in dieser Arbeit generierte monoklonale Antikörper gegen chCCRa und chCCRb könnte weitere Informationen über das Vorhandensein der Rezeptoren in verschiedenen Geweben geben. Auch könnten nach einer Infektion Änderungen im Expressionsprofil der Rezeptoren Aufschluss darüber geben, was K203 für eine Rolle in der frühen Immunantwort des Huhnes spielen könnte. Leider ist mit diesem Antikörper eine Unterscheidung der beiden Rezeptoren nicht möglich. Dass durch den Antikörper beide Rezeptoren erkannt werden, könnte sich damit begründen lassen, dass die genomische Struktur der beiden Rezeptoren sehr ähnlich ist. Dies könnte es auch in weiteren Versuchen sehr schwierig machen monoklonale Antikörper gegen den jeweils einzelnen Rezeptor herzustellen.

Sehr interessant könnte auch sein, das Expressionsprofil von K203 in infizierten und nicht Makrophagen zu betrachten. Anschließend könnten die Rezeptoren mit chCCRa/b1 geblockt werden. Bisher hat der Antikörper chCCRa/b1 allerdings noch keinen hemmenden Effekt auf die K203-Bindung gezeigt (Abbildung 16). Dies könnte beispielsweise an der eingesetzten Konzentration liegen. Grundsätzlich aber gibt es eine Vielfalt an Gründen die für dieses Ergebnis verantwortlich sein können. Dies wird mit Sicherheit Gegenstand weiterer Forschungsarbeit sein.

Mit dem im Kaninchen generierten Antiserum gegen K203 wurden bisher nur einige erste immunohistochemische Färbungen auf Gewebeschnitten durchgeführt (ohne Abbildung). Nach Etablierung könnte das Antiserum dann zum Nachweis von K203 in verschiedenen Geweben genutzt werden. Die Kinetik der K203-Expression im Caecum nach Salmonelleninfektion *in vivo* würde dann auch noch bildlich aufgezeigt werden können. Neutralisierende Antiseren können ebenso wie monoklonale Antikörper sehr gut direkt im Tier eingesetzt werden. Die Probleme, die bei der Interpretation der Ergebnisse auftreten können, wurden bereits eingehend diskutiert.

Dass K203 chemotaktische Aktivität besitzt konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden. Interessant wäre weiterhin aber die Frage, ob K203 zudem auch antimikrobielle Eigenschaften besitzt [148]. Diese Eigenschaft wurde für eine ganze Reihe von Chemokinen bereits gezeigt. Um dieser Fragestellung nachzugehen könnten Zellkulturüberstände, die das ungetaggte Chemokin enthalten, analog zum Chemotaxisassay titriert werden und zusammen mit verschiedenen Bakterienstämmen, ebenfalls in unterschiedlichen Verdünnungsstufen, inkubiert werden. Bereits 24h später



ließe sich anhand der Größe des Bakterienpellets bzw. der Trübung erkennen, ob K203 die Bakterien im Wachstum hemmen kann. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie konnten bereits erste Stämme untersucht werden, allerdings konnte bisher kein Unterschied im Bakterienwachstum beobachtet werden. Getestet wurden Stämme von *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* und *E.faecalis*. Interessant wäre natürlich im Besonderen, ob K203 bei den in den *in vivo* Versuchen eingesetzten Stämmen *S. Enteritidis* 147 und *C. jejuni* M11 eine antimikrobielle Wirkung aufweisen würde. Eine Quantifizierung der antimikrobiellen Wirkung könnte anschließend beispielsweise durch einen *Radial Diffusion Assay* erfolgen [148]. Dass bei den bisher durchgeführten Versuchen kein Unterschied erkennbar war, könnte mitunter daran liegen, dass die antimikrobielle Wirkung von Chemokinen oft erst durch Fragmentierung in kleinere Peptide zustande kommt [41]. Demnach müsste der Versuchsaufbau dahingehend abgeändert werden, dass die Inkubation der Bakterien mit dem vorab proteolytisch gespaltenen Chemokin erfolgt um so die Bedingungen *in vivo* möglichst exakt wiederzuspiegeln [149, 150].

In jedem Fall würde eine weitere funktionelle Charakterisierung von K203 noch viele interessante Aspekte klären können, besonders auch im Hinblick auf das noch sehr wenig untersuchte CCL16. Gerade die Tatsache, dass in diesem speziellen Fall die Maus als Modelltier nicht zur Verfügung steht und dass die Gemeinsamkeiten zwischen K203 und CCL16 stark auf eine Orthologie hinweisen, könnte das Huhn für die CCL16-Forschung sehr interessant machen.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Chemokine haben sowohl in der Homöostase als auch bei der Bekämpfung von Infektionen entscheidende Funktionen. Sie sind wichtige Mediatoren der frühen Immunantwort besonders im Hinblick auf die Migration von Immunzellen zum Ort der Inflammation. Beim Huhn ist über das Chemokinsystem noch sehr wenig bekannt. Genomische Analysen lassen inzwischen zwar viele Homologien zum Säuger vermuten, jedoch wurden bisher nur einige wenige aviäre Chemokine funktionell genauer untersucht.

Das aviäre Chemokin K203, das in der Literatur auch als chCCLi3 bezeichnet wird, wurde bereits vor über 10 Jahren entdeckt, jedoch nie genauer charakterisiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression von K203 bei diversen Infektionen des Huhnes im Darmgewebe oder in der Milz stark hochreguliert ist. Zudem zeigen vergleichende Genanalysen, dass K203 als das Ortholog des humanen CCL16 angesehen werden kann. Interessanterweise liegt CCL16 in der Maus nur als Pseudogen vor. Somit stellt diese Arbeit die erste Charakterisierung eines CCL16 Orthologs ausserhalb des Menschen dar.

Da K203 ursprünglich in einer LPS aktivierten Hühner-Makrophagen-Zelllinie entdeckt wurde, fokussierten sich erste Untersuchungen auf die Genexpression von K203 in kultivierten primären Hühnermakrophagen nach Stimulation mit weiteren TLR-Liganden sowie Muramyldipeptid und IFN $\gamma$ . Hierbei konnte die Induktion einer starken Expression von K203 nach LPS Stimulation bestätigt werden. Zudem konnten weitere Mikroben-assoziierte molekulare Muster identifiziert werden, die ebenfalls eine Hochregulierung der K203-Expression bewirkten. Die Liganden von TLR-3, TLR-7 und TLR-21, dem Ortholog zum TLR-9 des Säugers, konnten als weitere Induktoren von K203 in aviären Makrophagen identifiziert werden.

Anschließend detaillierte Genexpressionsanalysen von Blinddarmgewebe Salmonellen-infizierter Küken konnten erstmals eine exakte Kinetik der K203 Expression *in vivo* veranschaulichen. So ließ sich bereits 24 Stunden p.i. ein deutlicher Anstieg der Expression von K203 zeigen, der an Tag 2 p.i. sein Maximum erreicht und bis etwa 2 Wochen p.i. noch signifikant erhöht blieb. Dies ist insofern interessant, als dass eine Besiedlung der Blinddärme des Huhnes mit humanpathogenen Salmonellen bis etwa 6 Wochen p.i. nachweisbar ist. Diese Daten implizieren eine wichtige Rolle von K203 bei der Anlockung von Immunzellen zum Infektionsort und in der Abwehr von Pathogenen.

In durchflusszytometrischen Bindungsstudien konnten mithilfe eines K203-hu-Fc Fusionsproteins Zellpopulationen in Blut, Milz und Thymus identifiziert werden, die in der Lage waren, dieses Konstrukt zu binden, somit also einen Rezeptor für K203 exprimieren. 100% der Monozyten bzw. Makrophagen sowie Subpopulationen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren K203-R<sup>+</sup>. Für CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> doppelt positive T-Vorläuferzellen im Thymus konnte hingegen keine Bindung nachgewiesen werden.

Genomische Analysen legen nahe, dass die als chCCRa, chCCRb und chCCRc bezeichneten Chemokinrezeptoren Orthologe zu den humanen CCL16-Rezeptoren CCR1-3, CCR5 und CCR8 sein könnten. Zur weiteren Charakterisierung der K203-Rezeptoren wurden alle Kandidaten als eGFP markiertes Protein in HEK293T Zellen exprimiert und für K203-huFc Bindungsstudien genutzt. chCCRa und chCCRb zeigten eine deutliche Bindung von K203-huFc während chCCRc das Chemokinonstrukt nicht binden konnte. In weiteren Analysen konnte die Expression dieser Rezeptoren auch mittels RT-PCR bestätigt werden. Allerdings ergab sich hierbei kein Unterschied hinsichtlich ihrer Verteilung auf K203-R<sup>+</sup> Zellen.

HP89, eine Hühner-T-Zelllinie, war die einzige Zelllinie, für die eine Bindung von K203-hu-Fc gezeigt werden konnte. Mithilfe dieser Zellen sowie primären aviären Monozyten konnte in Migrationsassays nachgewiesen werden, dass das Chemokin K203 in der Lage ist gerichtete Chemotaxis auszulösen.

Für weitere Studien steht sowohl ein polyklonales Antiserum gegen K203 als auch ein kombinierter monoklonaler Antikörper gegen die Rezeptoren chCCRa und chCCRb zur Verfügung.

Ein Vergleich der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit den wenigen funktionellen Daten, die zu CCL16 bekannt sind, zeigt eine deutliche Homologie. CCL16 wird durch LPS und IFN $\gamma$  in Makrophagen induziert. Es lockt Monozyten bzw. Makrophagen sowie Lymphozyten an und bindet an die Rezeptoren CCR1-3 und CCR5 (entsprechen chCCRa und chCCRb).

## 8 SUMMARY

Chemokines have important functions both in homeostasis and in the control of infections. They are important mediators of the early immune response in particular with regard to the migration of immune cells to the site of inflammation. In chickens comparatively little is known about the chemokine system. Genomic analyzes suggest several homologies to the mammalian chemokine system, but only a few of the avian chemokines have been examined in detail.

The avian chemokine K203, that is also called chCCLi3, was discovered more than 10 years ago, but was never precisely characterized. From the literature it is known that the expression of K203 is strongly up-regulated during various infections in the gut tissue or spleen of chickens. In addition, comparative genetic studies consider K203 as an ortholog of human CCL16. Interestingly CCL16 exists only as a pseudogene in mice. Thus far, this work represents the first characterization of a CCL16 ortholog beside humans.

K203 was originally discovered in a LPS activated chicken macrophage cell line. Therefore, initial experiments focussed on gene expression analyzes of K203 in cultured primary chicken macrophages after stimulation with a range of TLR ligands, muramyl dipeptide and IFN $\gamma$ . A strong induction of K203 was confirmed after LPS stimulation. The ligands of TLR-3, TLR-7 and TLR-21, the ortholog of the mammalian TLR-9, could be further identified as inducers of K203 in avian macrophages. Subsequent gene expression analyzes in caecal tissue from *Salmonella* infected chicks provided exact kinetics of K203 expression *in vivo*. Within 24 hours p.i. a strong increase in the expression of K203 was observed. On day 2 p.i. K203 expression reached its maximum and remained significantly increased for about 2 weeks. In this respect it is interesting to note, that colonization of the chicken caeca with pathogenic *Salmonella spp.* is detectable for up to 6 weeks post infection. These studies imply an important role of K203 in the attraction of immune cells to the site of infection and the host defense against pathogens.

Using a K203-hu-Fc fusion protein in flow cytometric binding studies cell populations were identified in blood, spleen and thymus which carried a receptor for K203. 100 % of monocytes and macrophages and subsets of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T- cells were K203-R<sup>+</sup>. However, for CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> double positive T-precursors in the thymus no binding was detected.

Genomic analyzes suggest that the chemokine receptors known as chCCRa, chCCRb and chCCRc could be orthologs to the human CCL16 receptors CCR1-3, CCR5 and CCR8. To further characterize the K203 receptors, all candidates have been expressed as eGFP labeled proteins in HEK293T cells and used for K203-huFc binding studies. chCCRa and chCCRb showed significant binding of K203-huFc whereas chCCRc could not bind the chemokine. In further analyzes the expression of these receptors has been confirmed by RT-PCR. However, this resulted in no difference concerning the distribution of the receptors on K203-hu-Fc positive cells.

HP89, a chicken T-cell line, was the only cell line capable of binding K203-hu-Fc. Migration assays with these cells as well as avian monocytes confirmed that K203 is able to induce directed chemotaxis.

For further studies both a polyclonal antiserum against K203 and a combined monoclonal antibody against the receptors chCCRa and chCCRb were developed.

Comparing the results of this study with the limited number of functional data available for CCL16, a high homology can be seen. CCL16 is induced by LPS and IFN $\gamma$  in macrophages. It attracts monocytes and macrophages as well as lymphocytes and binds to the receptors CCR1-3 and CCR5 (equivalents of chCCRa and chCCRb).

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Allen, S.J., S.E. Crown, and T.M. Handel, *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 787-820.
2. Katsumoto, K. and S. Kume, *The role of CXCL12-CXCR4 signaling pathway in pancreatic development*. Theranostics, 2013. **3**(1): p. 11-7.
3. Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia, *The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 593-620.
4. Kaiser, P., et al., *A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(8): p. 467-84.
5. Hughes, S. and N. Bumstead, *The gene encoding the chicken chemokine K60 maps to chromosome 4*. Anim Genet, 2000. **31**(6): p. 418-9.
6. Kaiser, P., S. Hughes, and N. Bumstead, *The chicken 9E3/CEF4 CXC chemokine is the avian orthologue of IL8 and maps to chicken chromosome 4 syntenic with genes flanking the mammalian chemokine cluster*. Immunogenetics, 1999. **49**(7-8): p. 673-84.
7. Busalt, F.C., *Untersuchungen zur Rolle von CXCR4 und CXCR5 in der B-Zell-Entwicklung beim Huhn*. 2013, LMU München: ediss:15765.
8. Sick, C., et al., *Novel chicken CXC and CC chemokines*. Cytokine, 2000. **12**(3): p. 181-6.
9. Hughes, S., et al., *Re-evaluation of the chicken MIP family of chemokines and their receptors suggests that CCL5 is the prototypic MIP family chemokine, and that different species have developed different repertoires of both the CC chemokines and their receptors*. Dev Comp Immunol, 2007. **31**(1): p. 72-86.
10. Laurent, F., et al., *Analysis of chicken mucosal immune response to Eimeria tenella and Eimeria maxima infection by quantitative reverse transcription-PCR*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2527-34.
11. Hong, Y.H., et al., *Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following Eimeria maxima infection of chickens*. Vet Immunol Immunopathol, 2006. **114**(3-4): p. 259-72.
12. Tsai, H.J., et al., *A time-course study of gene responses of chicken granulosa cells to Salmonella Enteritidis infection*. Vet Microbiol, 2010. **144**(3-4): p. 325-33.
13. Li, S., et al., *Induction of CXC chemokine messenger-RNA expression in chicken oviduct epithelial cells by Salmonella enterica serovar enteritidis via the type three secretion system-I*. Avian Dis, 2009. **53**(3): p. 396-404.

14. Breithaupt, U., *Genexpressionsanalysen der frühen angeborenen Immunantwort des Haushuhns induziert durch eine Infektion mit Salmonella enteritidis mit Hilfe der Microarray Technologie*. 2011, LMU München: ediss:12985.
15. *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011 has been published*. Euro Surveill, 2013. **18**(15): p. 20449.
16. Gantois, I., et al., *Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis*. FEMS Microbiol Rev, 2009. **33**(4): p. 718-38.
17. Fukuda, S., et al., *Genomic organization of the genes for human and mouse CC chemokine LEC*. DNA Cell Biol, 1999. **18**(4): p. 275-83.
18. Baggiolini, M. and A. Walz, *[Naf/nap-1, a new peptide which activates neutrophil leukocytes]*. Schweiz Med Wochenschr, 1989. **119**(38): p. 1285-9.
19. Walz, A., et al., *Structure and properties of a novel neutrophil-activating factor (NAF) produced by human monocytes*. Agents Actions, 1989. **26**(1-2): p. 148-50.
20. Modi, W.S., et al., *Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily*. Hum Genet, 1990. **84**(2): p. 185-7.
21. Bacon, K., et al., *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*. J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(10): p. 1067-8.
22. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *The chemokine superfamily revisited*. Immunity, 2012. **36**(5): p. 705-16.
23. Laing, K.J. and C.J. Secombes, *Chemokines*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 443-60.
24. Colobran, R., et al., *Copy number variation in chemokine superfamily: the complex scene of CCL3L-CCL4L genes in health and disease*. Clin Exp Immunol, 2010. **162**(1): p. 41-52.
25. Clark-Lewis, I., et al., *Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3574-7.
26. Baggiolini, M., B. Moser, and I. Clark-Lewis, *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. The Giles Filley Lecture*. Chest, 1994. **105**(3 Suppl): p. 95s-98s.
27. Stievano, L., E. Piovan, and A. Amadori, *C and CX3C chemokines: cell sources and physiopathological implications*. Crit Rev Immunol, 2004. **24**(3): p. 205-28.

28. Brueckmann, M., et al., *Recombinant human activated protein C upregulates the release of soluble fractalkine from human endothelial cells*. Br J Haematol, 2006. **133**(5): p. 550-7.
29. Schulte, A., et al., *Sequential processing of the transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 by alpha- and gamma-secretases*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(1): p. 233-40.
30. Paavola, C.D., et al., *Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33157-65.
31. Rajarathnam, K., I. Clark-Lewis, and B.D. Sykes, *1H NMR solution structure of an active monomeric interleukin-8*. Biochemistry, 1995. **34**(40): p. 12983-90.
32. Laurence, J.S., et al., *CC chemokine MIP-1 beta can function as a monomer and depends on Phe13 for receptor binding*. Biochemistry, 2000. **39**(12): p. 3401-9.
33. Proudfoot, A.E., et al., *Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1885-90.
34. Forster, R., et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. Cell, 1999. **99**(1): p. 23-33.
35. Campbell, J.J. and E.C. Butcher, *Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(3): p. 336-41.
36. Cyster, J.G., *Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs*. Science, 1999. **286**(5447): p. 2098-102.
37. Comerford, I., et al., *A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system*. Cytokine Growth Factor Rev, 2013. **24**(3): p. 269-83.
38. Meurens, F., et al., *Expression of mucosal chemokines TECK/CCL25 and MEC/CCL28 during fetal development of the ovine mucosal immune system*. Immunology, 2007. **120**(4): p. 544-55.
39. Meurens, F., et al., *Expression of TECK/CCL25 and MEC/CCL28 chemokines and their respective receptors CCR9 and CCR10 in porcine mucosal tissues*. Vet Immunol Immunopathol, 2006. **113**(3-4): p. 313-27.
40. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response*. Lab Invest, 2002. **82**(5): p. 521-33.



41. Krijgsveld, J., et al., *Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20374-81.
42. Yeaman, M.R., *The role of platelets in antimicrobial host defense*. Clin Infect Dis, 1997. **25**(5): p. 951-68; quiz 969-70.
43. Linge, H.M., et al., *The human CXC chemokine granulocyte chemotactic protein 2 (GCP-2)/CXCL6 possesses membrane-disrupting properties and is antibacterial*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(7): p. 2599-607.
44. Cole, A.M., et al., *Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 623-7.
45. Hieshima, K., et al., *CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1452-61.
46. Yang, D., et al., *Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(3): p. 448-55.
47. Maerki, C., et al., *Potent and broad-spectrum antimicrobial activity of CXCL14 suggests an immediate role in skin infections*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 507-14.
48. Pierce, K.L., R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 639-50.
49. Zlotnik, A., O. Yoshie, and H. Nomiya, *The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution*. Genome Biol, 2006. **7**(12): p. 243.
50. Borroni, E.M., et al., *Chemoattractant receptors and leukocyte recruitment: more than cell migration*. Sci Signal, 2009. **2**(59): p. pe10.
51. Rovati, G.E., V. Capra, and R.R. Neubig, *The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(4): p. 959-64.
52. Bannert, N., et al., *Sialylated O-glycans and sulfated tyrosines in the NH2-terminal domain of CC chemokine receptor 5 contribute to high affinity binding of chemokines*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1661-73.
53. Monteclaro, F.S. and I.F. Charo, *The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1alpha receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19084-92.
54. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 469-99.

55. Gupta, S.K., et al., *Pharmacological evidence for complex and multiple site interaction of CXCR4 with SDF-1alpha: implications for development of selective CXCR4 antagonists*. Immunol Lett, 2001. **78**(1): p. 29-34.
56. Neptune, E.R. and H.R. Bourne, *Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14489-94.
57. Hannigan, M., et al., *Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3603-8.
58. Chhabra, E.S. and H.N. Higgs, *The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(10): p. 1110-21.
59. Curnock, A.P., M.K. Logan, and S.G. Ward, *Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases*. Immunology, 2002. **105**(2): p. 125-36.
60. Zhang, Y. and H. Wang, *Integrin signalling and function in immune cells*. Immunology, 2012. **135**(4): p. 268-75.
61. Moon, M.Y., et al., *Small GTPase Rap1 regulates cell migration through regulation of small GTPase RhoA activity in response to transforming growth factor-beta1*. J Cell Physiol, 2013. **228**(11): p. 2119-26.
62. Wu, Y. and A. Yoder, *Chemokine coreceptor signaling in HIV-1 infection and pathogenesis*. PLoS Pathog, 2009. **5**(12): p. e1000520.
63. Croft, W., et al., *A physiologically required G protein-coupled receptor (GPCR)-regulator of G protein signaling (RGS) interaction that compartmentalizes RGS activity*. J Biol Chem, 2013. **288**(38): p. 27327-42.
64. Krupnick, J.G. and J.L. Benovic, *The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998. **38**: p. 289-319.
65. Zhang, J., et al., *Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization*. J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18302-5.
66. Wu, D., G.J. LaRosa, and M.I. Simon, *G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8*. Science, 1993. **261**(5117): p. 101-3.
67. Mellado, M., et al., *Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 397-421.
68. Nibbs, R.J., et al., *Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6. Comparison to three other related macrophage inflammatory protein-*

- Ialpha receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5.* J Biol Chem, 1997. **272**(19): p. 12495-504.
69. Bonini, J.A., et al., *Cloning, expression, and chromosomal mapping of a novel human CC-chemokine receptor (CCR10) that displays high-affinity binding for MCP-1 and MCP-3.* DNA Cell Biol, 1997. **16**(10): p. 1249-56.
70. Mantovani, A., R. Bonecchi, and M. Locati, *Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(12): p. 907-18.
71. Graham, G.J., et al., *The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors.* Immunol Lett, 2012. **145**(1-2): p. 30-8.
72. Tournamille, C., et al., *Structure-function analysis of the extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines: characterization of antibody and chemokine binding sites.* Br J Haematol, 2003. **122**(6): p. 1014-23.
73. Novitzky-Basso, I. and A. Rot, *Duffy antigen receptor for chemokines and its involvement in patterning and control of inflammatory chemokines.* Front Immunol, 2012. **3**: p. 266.
74. Shakri, A.R., M.M. Rizvi, and C.E. Chitnis, *Development of quantitative receptor-ligand binding assay for use as a tool to estimate immune responses against Plasmodium vivax Duffy binding protein Region II.* J Immunoassay Immunochem, 2012. **33**(4): p. 403-13.
75. Zimmerman, P.A., et al., *Red blood cell polymorphism and susceptibility to Plasmodium vivax.* Adv Parasitol, 2013. **81**: p. 27-76.
76. Zhao, Y., et al., *Duffy antigen receptor for chemokines mediates chemokine endocytosis through a macropinocytosis-like process in endothelial cells.* PLoS One, 2011. **6**(12): p. e29624.
77. *Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution.* Nature, 2004. **432**(7018): p. 695-716.
78. Wallis, J.W., et al., *A physical map of the chicken genome.* Nature, 2004. **432**(7018): p. 761-4.
79. Martins-Green, M. and J.E. Feugate, *The 9E3/CEF4 gene product is a chemotactic and angiogenic factor that can initiate the wound-healing cascade in vivo.* Cytokine, 1998. **10**(7): p. 522-35.
80. Hughes, S. and N. Bumstead, *Mapping of the gene encoding a chicken homologue of the mammalian chemokine SCYA4.* Anim Genet, 1999. **30**(5): p. 404.

81. Petrenko, O., I. Ischenko, and P.J. Enrietto, *Isolation of a cDNA encoding a novel chicken chemokine homologous to mammalian macrophage inflammatory protein-1 beta*. Gene, 1995. **160**(2): p. 305-6.
82. Hughes, S., et al., *Identification, mapping, and phylogenetic analysis of three novel chicken CC chemokines*. Immunogenetics, 2001. **53**(8): p. 674-83.
83. Wang, J., et al., *Genomic organization, annotation, and ligand-receptor inferences of chicken chemokines and chemokine receptor genes based on comparative genomics*. BMC Genomics, 2005. **6**: p. 45.
84. DeVries, M.E., et al., *Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 401-15.
85. Djeraba, A., et al., *Similar pattern of iNOS expression, NO production and cytokine response in genetic and vaccination-acquired resistance to Marek's disease*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. **85**(1-2): p. 63-75.
86. Bar-Shira, E. and A. Friedman, *Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(10): p. 930-41.
87. Zhang, S., et al., *Transcriptional response of chicken macrophages to Salmonella enterica serovar enteritidis infection*. Dev Biol (Basel), 2008. **132**: p. 141-51.
88. Nomiyama, H., et al., *Human CC chemokine liver-expressed chemokine/CCL16 is a functional ligand for CCR1, CCR2 and CCR5, and constitutively expressed by hepatocytes*. Int Immunol, 2001. **13**(8): p. 1021-9.
89. Howard, O.M., et al., *LEC induces chemotaxis and adhesion by interacting with CCR1 and CCR8*. Blood, 2000. **96**(3): p. 840-5.
90. Nakayama, T., et al., *Liver-expressed chemokine/CC chemokine ligand 16 attracts eosinophils by interacting with histamine H4 receptor*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 2078-83.
91. Shoudai, K., et al., *Isolation of cDNA encoding a novel human CC chemokine NCC-4/LEC*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1396**(3): p. 273-7.
92. Hedrick, J.A., et al., *Characterization of a novel CC chemokine, HCC-4, whose expression is increased by interleukin-10*. Blood, 1998. **91**(11): p. 4242-7.
93. Youn, B.S., et al., *Isolation and characterization of LMC, a novel lymphocyte and monocyte chemoattractant human CC chemokine, with myelosuppressive activity*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(2): p. 217-22.

94. Cappello, P., et al., *CCL16/LEC powerfully triggers effector and antigen-presenting functions of macrophages and enhances T cell cytotoxicity*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(1): p. 135-42.
95. Cappello, P., et al., *CC-chemokine ligand 16 induces a novel maturation program in human immature monocyte-derived dendritic cells*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 6143-51.
96. Musso, T., et al., *IL-10 enhances CCL2 release and chemotaxis induced by CCL16 in human monocytes*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2005. **18**(2): p. 339-49.
97. Kinde, H., et al., *Sewage effluent: likely source of Salmonella enteritidis, phage type 4 infection in a commercial chicken layer flock in southern California*. Avian Dis, 1996. **40**(3): p. 672-6.
98. Kinde, H., et al., *Salmonella enteritidis, phase type 4 infection in a commercial layer flock in southern California: bacteriologic and epidemiologic findings*. Avian Dis, 1996. **40**(3): p. 665-71.
99. Davies, R.H. and M. Breslin, *Persistence of Salmonella enteritidis phage type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm*. Environ Microbiol, 2003. **5**(2): p. 79-84.
100. Poppe, C., et al., *The prevalence of Salmonella enteritidis and other Salmonella sp. among Canadian registered commercial chicken broiler flocks*. Epidemiol Infect, 1991. **107**(1): p. 201-11.
101. Blaser, M.J. and L.S. Newman, *A review of human salmonellosis: I. Infective dose*. Rev Infect Dis, 1982. **4**(6): p. 1096-106.
102. Gast, R.K. and P.S. Holt, *Deposition of phage type 4 and 13a Salmonella enteritidis strains in the yolk and albumen of eggs laid by experimentally infected hens*. Avian Dis, 2000. **44**(3): p. 706-10.
103. Gast, R.K. and C.W. Beard, *Production of Salmonella enteritidis-contaminated eggs by experimentally infected hens*. Avian Dis, 1990. **34**(2): p. 438-46.
104. Sadler, W.W., J.R. Brownell, and M.J. Fanelli, *Influence of age and inoculum level on shed pattern of Salmonella typhimurium in chickens*. Avian Dis, 1969. **13**(4): p. 793-803.
105. Van Immerseel, F., et al., *Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a Salmonella enteritidis strain*. Dev Comp Immunol, 2002. **26**(4): p. 355-64.
106. Berndt, A., et al., *Chicken cecum immune response to Salmonella enterica serovars of different levels of invasiveness*. Infect Immun, 2007. **75**(12): p. 5993-6007.

107. Li, S., et al., *Functions exerted by the virulence-associated type-three secretion systems during Salmonella enterica serovar Enteritidis invasion into and survival within chicken oviduct epithelial cells and macrophages*. Avian Pathol, 2009. **38**(2): p. 97-106.
108. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
109. DuBridge, R.B., et al., *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(1): p. 379-87.
110. Vink, T., et al., *A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies*. Methods, 2014. **65**(1): p. 5-10.
111. Beug, H., et al., *Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation*. Cell, 1979. **18**(2): p. 375-90.
112. Akiyama, Y. and S. Kato, *Two cell lines from lymphomas of Marek's disease*. Biken J, 1974. **17**(3): p. 105-16.
113. Nazerian, K., *An updated list of avian cell lines and transplantable tumours*. Avian Pathol, 1987. **16**(3): p. 527-44.
114. Buerstedde, J.M., et al., *Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line*. Embo j, 1990. **9**(3): p. 921-7.
115. Puehler, F., et al., *A sensitive bioassay for chicken interleukin-18 based on the inducible release of preformed interferon-gamma*. J Immunol Methods, 2003. **274**(1-2): p. 229-32.
116. Bottazzi, M.E., et al., *BM2L is a spontaneous leukemogenic variant of a non-leukemogenic v-myb-transformed myeloid cell line*. Oncogene, 1993. **8**(3): p. 731-6.
117. Qureshi, M.A., et al., *Establishment and characterization of a chicken mononuclear cell line*. Vet Immunol Immunopathol, 1990. **26**(3): p. 237-50.
118. Weining, K.C., et al., *Biological properties of recombinant chicken interferon-gamma*. Eur J Immunol, 1996. **26**(10): p. 2440-7.
119. Tregaskes, C.A., et al., *Chicken B-cell marker chB6 (Bu-1) is a highly glycosylated protein of unique structure*. Immunogenetics, 1996. **44**(3): p. 212-7.
120. Rothwell, C.J., L. Vervelde, and T.F. Davison, *Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20*. Vet Immunol Immunopathol, 1996. **55**(1-3): p. 225-34.
121. Chen, C.L., et al., *Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens*. J Exp Med, 1986. **164**(1): p. 375-80.

122. Chan, M.M., et al., *Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens*. J Immunol, 1988. **140**(7): p. 2133-8.
123. Luhtala, M., et al., *Characterization of chicken CD8-specific monoclonal antibodies recognizing novel epitopes*. Scand J Immunol, 1995. **42**(1): p. 171-4.
124. Sowder, J.T., et al., *A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor*. J Exp Med, 1988. **167**(2): p. 315-22.
125. Chen, C.L., et al., *Differential expression of two T cell receptors, TcR1 and TcR2, on chicken lymphocytes*. Eur J Immunol, 1988. **18**(4): p. 539-43.
126. Chen, C.H., et al., *TCR3: a third T-cell receptor in the chicken*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2351-5.
127. Mast, J., et al., *Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. **61**(2-4): p. 343-57.
128. Kaspers, B., H.S. Lillehoj, and E.P. Lillehoj, *Chicken macrophages and thrombocytes share a common cell surface antigen defined by a monoclonal antibody*. Vet Immunol Immunopathol, 1993. **36**(4): p. 333-46.
129. Yano, S., et al., *Intestinal Carriage and Excretion of Campylobacter jejuni in Chickens Exposed at Different Ages*. J Food Prot, 2014. **77**(7): p. 1184-7.
130. Muller, S., et al., *Salt-dependent chemotaxis of macrophages*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73439.
131. Brownlie, R., et al., *Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides*. Mol Immunol, 2009. **46**(15): p. 3163-70.
132. Ahmad-Nejad, P., et al., *Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments*. Eur J Immunol, 2002. **32**(7): p. 1958-68.
133. Lopez-Yglesias, A.H., et al., *Flagellin Induces Antibody Responses through a TLR5- and Inflammasome-Independent Pathway*. J Immunol, 2014. **192**(4): p. 1587-96.
134. He, H., et al., *Profile of Toll-like receptor expressions and induction of nitric oxide synthesis by Toll-like receptor agonists in chicken monocytes*. Mol Immunol, 2006. **43**(7): p. 783-9.
135. Methner, U., S. al-Shabibi, and H. Meyer, *Experimental oral infection of specific pathogen-free laying hens and cocks with Salmonella enteritidis strains*. Zentralbl Veterinarmed B, 1995. **42**(8): p. 459-69.

136. Sadeyen, J.R., et al., *Salmonella carrier-state in hens: study of host resistance by a gene expression approach*. Microbes Infect, 2006. **8**(5): p. 1308-14.
137. Shaughnessy, R.G., et al., *Innate immune gene expression differentiates the early avian intestinal response between Salmonella and Campylobacter*. Vet Immunol Immunopathol, 2009. **132**(2-4): p. 191-8.
138. Smith, P.D., et al., *Intestinal macrophages and response to microbial encroachment*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(1): p. 31-42.
139. White, G.E., A.J. Iqbal, and D.R. Greaves, *CC chemokine receptors and chronic inflammation--therapeutic opportunities and pharmacological challenges*. Pharmacol Rev, 2013. **65**(1): p. 47-89.
140. Lederman, M.M., et al., *Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment*. Jama, 2006. **296**(7): p. 815-26.
141. Qu, C., et al., *Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes*. J Exp Med, 2004. **200**(10): p. 1231-41.
142. Viola, A. and A.D. Luster, *Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008. **48**: p. 171-97.
143. Salanga, C.L., M. O'Hayre, and T. Handel, *Modulation of chemokine receptor activity through dimerization and crosstalk*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(8): p. 1370-86.
144. Schusser, B., et al., *Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(50): p. 20170-5.
145. Plachy, J., et al., *Protective effects of type I and type II interferons toward Rous sarcoma virus-induced tumors in chickens*. Virology, 1999. **256**(1): p. 85-91.
146. Cihak, J., et al., *Inhibition of the development of spontaneous autoimmune thyroiditis in the obese strain (OS) chickens by in vivo treatment with anti-CD4 or anti-CD8 antibodies*. J Autoimmun, 1998. **11**(2): p. 119-26.
147. Cihak, J., et al., *T cells expressing the V beta 1 T-cell receptor are required for IgA production in the chicken*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10951-5.
148. Yung, S.C. and P.M. Murphy, *Antimicrobial chemokines*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 276.
149. Brandt, E., J. Van Damme, and H.D. Flad, *Neutrophils can generate their activator neutrophil-activating peptide 2 by proteolytic cleavage of platelet-derived connective tissue-activating peptide III*. Cytokine, 1991. **3**(4): p. 311-21.



- 
150. Harter, L., et al., *Connective tissue-activating peptide III desensitizes chemokine receptors on neutrophils. Requirement for proteolytic formation of the neutrophil-activating peptide 2*. J Immunol, 1994. **153**(12): p. 5698-708.

## 10 ANHANG

### A) Chemikalien und Reagenzien

Die im Folgenden gelisteten Bezugsquellen sind in Kapitel 4 als Hochzahlen hinter den jeweiligen Reagenzien gelistet.

- 1 PRO-LAB, Ontario
- 2 SIFIN, Berlin
- 3 Applichem, Darmstadt
- 4 Biochrom, Berlin
- 5 Rotexmedica, Trittau
- 6 Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- 7 Bio & SELL e.K., Feucht
- 8 Institut für Tierphysiologie, München
- 9 Sigma Aldrich, Saint Louis/USA
- 10 Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
- 11 Invivogen, Toulouse, Frankreich
- 12 AIR LIQUIDE, Düsseldorf
- 13 Thermo Scientific, Waltham, USA
- 14 Institute for Animal Science and Health, Lelystad, Niederlande
- 15 Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., New Market/UK
- 16 Merck, Darmstadt
- 17 Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
- 18 Roche, Mannheim
- 19 Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
- 20 Fermentas GmbH, St- Leon-Rot
- 21 Schleicher und Schuell, Dassel
- 22 BioRad, München
- 23 Amersham/GE Healthcare, München
- 24 Roth, Karlsruhe
- 25 Bioprocessing Ltd, Consett, UK
- 26 Life Technologies GmbH, Darmstadt
- 27 Promega Corp., Mannheim
- 28 Solis Biodyne, Tartu, Estland
- 29 MWG(Eurofins Genomics), Ebersberg
- 30 Lonza Group AG, Basel, Schweiz
- 31 Southern Biotechnologies, Birmingham/USA
- 32 Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
- 33 Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
- 34 Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
- 35 Corning Incorporated, Corning, NY/USA

**B) Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge**

Gerät	Modellname	Herstellerfirma
Absaugpumpe	HLC, AF204	Heap Labor Consult, Bovenden
Analysewaage	Mettler PJ400	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Bakterienbrutschrank	Mini Inkubator	Labnet International. Inc., Woodbridge, USA
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Applied Biosciences, Darmstadt
Brüter (Stall)	BSS 300/8203	Grumbach Brutgeräte GmbH, Asslar
Brutschrank für die Zellkultur	MCO-20AIC	Sanyo, München
Brutschrank für die Zellkultur	Galaxy R	Nunc, Wiesbaden
Chemilumineszenz-System	MicroChemi 4.2	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Chromatographie-Anlage	Bio-Rad BiolLogic LP mit Model2100 Fraction Collector	Bio-Rad, München
Dampfsterilisator	Varioklav Typ 500E	Thermo Scientific, München
Durchflussszytometer	BD FACSCantoII	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Durchflussszytometer/Sortierer	BD FACSAria II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Flockeneisbereiter	Scotsman AF100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Gel Dokumentation	Image Quant 300	GE Healthcare, Garching
Gelkammer	Mini-Sub®-cell GT	Bio-Rad, München
Handzentrifuge	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Homogenisator	Precellys24	Peqlab, Erlangen
Kryotom	Kryostat HM5000M	Mikrom International GmbH, Walldorf
Magnetrührer	IKAMAG®RCT	IKA®Werke GmbH + Co.KG, Staufen
Mikroskop	Leica DMIL Kamera: DFC340FX	Leica, Bensheim
Mikroskop	Zeiss Axioskop	Zeiss, Göttingen
Mikrowelle S2	MS1987U	LG Electronics, Ratingen
Mikrozentrifuge	5415R	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Workstation	Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	Peqlab, Erlangen
Power Supply	Power Pac 300	Bio-Rad, München
qPCR System	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosciences, Darmstadt
Schüttelinkubator	Schüttler KS15A	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
SDS-Gel-Gieskammer	Mini Potean III	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank	Mikroflow	Nunc, Wiesbaden
Spectrophotometer	NanoDrop ND-100	Peqlab, Erlangen
Tank-Blotter	Criterion Blotter	Bio-Rad, München
Thermocycler	MJ Mini	Bio-Rad, München
Thermoschüttler	TS 1 Thermoshaker	Biometra, Göttingen
UV-Bildschirm zur Gelpräparation	TFP-20.L	Spicker KaDie, Schwandorf
Vortex-Mixer	GVLab®	Gilson Inc., Middleton, USA
Wärmeschrank	Universal Basic 391	neoLab, Heidelberg
Wasserbad	GFL1004	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

---

Zählkammer	modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	4K15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Zentrifuge	Centrifuge 5810	Eppendorf, Köln

---

## 11 DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich im Besonderen bei Professor Dr. Bernd Kaspers für die Überlassung des Dissertationsthemas, das mich im Laufe der Zeit immer mehr faszinierte. Ihm sowie Dr. habil. Sonja Härtle möchte ich zudem großen Dank für die herausragende Betreuung meiner Dissertation aussprechen.

Dr. Benjamin Schusser gebührt mein ganz besonderer Dank im Hinblick auf die Publikation. Er hat mich mit unermüdlichem Ehrgeiz und Elan bei der Anfertigung sowie den vielen Fragen und Problemen unterstützt. Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Tierphysiologie, besonders jenen der AG Kaspers, möchte ich mich für das gute Arbeitsklima sowie jegliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken.

Bei Marina Kohn und Beatrice Schärer bedanke ich mich ganz besonders für die große Geduld und die öfter notwendige „Urlaubsversorgung“ meiner Zellen. Ingrid Riehl danke ich für ihre große Hilfe beim Aufreinigen verschiedener Proteine sowie für die Unterstützung in allen Fragen des Western Blottings.

Bei Dr. Susanne Schwarz möchte ich mich für die Einführung in molekularbiologische Arbeitsmethoden bedanken. Sie stand mir zudem immer mit Tipps und Tricks zu verschiedenen Computerprogrammen hilfreich zur Seite.

Für die Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei Hedi Opitz, Fritz Meggendorfer, Andreas Schöffmann und Thomas Hoschka.

Frau Gotterbauer und Frau Adler vom Pettenkofer-Institut gilt ebenfalls mein Dank. Bei jeglichen Problemen in organisatorischen Dingen standen sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Dieser Dank gilt auch an die beiden Damen im Institut für Tierphysiologie, Frau Crass und Frau Summer.

Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich auch allen Doktoranden des Instituts aussprechen, im Besonderen Susanne Röhl, Florian Busalt, Julia Schermuly, Sarah Lettmann, Maria Zechmann, Christian Straub, Marie-Luise Neulen, Vanessa Turowski, Christoph Szober und Kerstin Euler. Ihr offenes Ohr, die große Hilfsbereitschaft, die aufmunternden Kaffeepausen und die immer wieder lustigen Stammtische werden mir diese Zeit in bester Erinnerung erhalten.

Desweiteren möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir schon im Studium (auch in finanziellen Dingen) immer eine große Stütze war. Abschließend möchte ich nicht vergessen, meinem Freund Walter zu danken, der auch in schwierigen Momenten immer an mich geglaubt hat.